



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**A maturação fenólica em uvas tintas.
Comparação de metodologias**

Pedro Tiago Relvas Correia

Orientação: Professora Doutora Maria João Cabrita

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**A maturação fenólica em uvas tintas.
Comparação de metodologias**

Pedro Tiago Relvas Correia

Orientação: Professora Doutora Maria João Cabrita

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2014

RESUMO

A maturação fenólica em uvas tintas é uma importante ferramenta de ajuda na decisão de vindima. Com o presente trabalho pretende-se estudar uma nova metodologia de avaliação de parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas tintas, em comparação com metodologias mais habituais.

Neste contexto a maturação fenólica de uvas foi avaliada através de espectrofotometria de refletância difusa e através dos métodos de bancada e dos métodos baseados em espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier (FTIR).

Os parâmetros de cor obtidos através das 3 metodologias serão comparados por forma a se tentar compreender as vantagens e desvantagens da metodologia de refletância difusa, que é uma nova metodologia para a qual se carece de informação.

Palavras-chave: maturação fenólica; espectrofotometria de refletância difusa; uvas tintas.

The phenolic ripeness in grapes. Comparison of methodologies

ABSTRACT

The phenolic ripeness in grapes is an important tool to aid in the decision to harvest. The present work aims to study a new methodology for evaluation of parameters related to the phenolic ripeness of grapes, compared to more usual methods.

In this context the phenolic ripening of grapes was assessed by diffuse reflectance spectroscopy and counter-methods and methods based on infra-red spectroscopy Fourier transform (FTIR).

The color parameters obtained from the three methods are compared in order to try to understand the advantages and disadvantages of the diffuse reflectance method, which is a new methodology for which it needs information.

Keywords: phenolic ripeness; diffuse reflectance spectrophotometry; red grapes.

"O Vinho é uma prova constante de que Deus nos ama e deseja ver-nos felizes"
(Benjamim Franklin)

Dedico esta dissertação aos meus pais, à
minha esposa e à memória do meu avô
Francisco Relvas, "Mestre Patarata".

AGRADECIMENTOS

Chegado o final do trabalho não poderia de deixar agradecer a colaboração e disponibilidade de todas as pessoas sem as quais, de uma maneira ou de outra, a sua realização seria impossível. Por isso quero expressar a minha gratidão a todos, nomeadamente:

À Professora Doutora Maria João Cabrita, minha orientadora, pela sua disponibilidade, apoio, ajuda, simpatia e amizade que sempre demonstrou.

A todos os docentes do Mestrado em Viticultura e Enologia, que se empenharam e dedicaram a transmitir conhecimentos, de modo a construir a minha formação.

À minha família, principalmente à minha esposa e aos meus pais, um obrigado muito especial. Pelo carinho, amor, amizade, encorajamento e dedicação que me demonstraram ao longo destes anos.

Aos meus colegas de trabalho da CARMIM e colegas de mestrado pelo constante encorajamento e apoio na realização da componente prática deste trabalho.

A todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ACRÓNIMOS

ABS – absorvância.

AT – Antocianinas potenciais ou totais.

EA – extratibilidade das antocianinas.

FTIR – espectrofotometria de Infra Vermelhos com Transformada de Fourier.

IPT – Índice de polifenóis totais.

MP – contribuição dos taninos provenientes das grainhas.

N – nuance.

Nm – nanómetros.

QP – qualidade fenólica.

R – refletância.

WEB – World Wide Web.

ÍNDICE

Resumo	I
Abstract	II
Agradecimentos.....	IV
Acrónimos	V
Índice.....	VI
Lista de Tabelas.....	VIII
Lista de Figuras	VIII
Capítulo 1 Introdução.....	13
1.1. Introdução	14
1.2. Objetivos e síntese da metodologia de trabalho.....	16
1.3. Contribuição Científica	17
1.4. Organização e Estrutura da tese	17
Capítulo 2 revisão do conhecimento	18
2.1. Compostos Fenólicos.....	19
2.1.1. Compostos de natureza não flavonóide.....	21
2.1.2. Compostos de natureza flavonóide.....	23
2.1.2.1. Antocianinas	25
2.2. A maturação da uva	27
2.2.1 Evolução dos Compostos Fenólicos	29
2.3. Métodos de Análise.....	31
2.3.1. Metodologia clássica.....	32
2.3.2. FTIR - Espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier	34
2.3.3 Refletância difusa	36
2.3.3.1. Equipamento MT00 (Maselli Misure)	38
Capítulo 3 Metodologia e resultados.....	43
3.1. Introdução	44
3.2. Colheita de amostras e metodologias	44
3.2.1. Análise aos compostos fenólicos	45

3.2.1.1. Análise de bancada	45
3.2.1.2. Análise por FTIR	48
3.2.1.3. Análise por refletância difusa	48
3.2.2. Análises gerais.....	50
3.2.2.1. Açúcares.....	50
3.2.2.2. pH.....	51
3.2.2.3. Acidez total	51
3.3 Resultados	52
3.3.1 Características das uvas em análise.....	52
3.3.2 Determinação de antocianinas totais	53
3.3.3 Determinação de antocianinas extraíveis	55
3.3.4 Determinação do Índice de Polifenóis Totais - IPT	58
3.3.5 Determinação da Extratibilidade das Antocianinas - EA (%).....	59
3.3.6 Determinação da contribuição dos taninos das grainhas - MP (%).....	60
3.3.7 Maturação fenólica pela metodologia de refletância difusa.....	61
Capítulo 4 Discussão, Conclusão e Recomendações.....	63
4.1. Considerações Finais.....	64
4.2. Conclusões	65
4.3. Perspetivas futuras.....	66
Capítulo 5 bibliografia	67
5. Bibliografia	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos vários modelos do MT00 (Raccagni, 2011).	41
Tabela 2 – Valores de máximo, mínimo, média e desvio padrão de álcool provável, acidez total e pH, do universo de amostras em estudo.	52
Tabela 3 – Valores de máximo, mínimo, média, desvio padrão e fator de correlação de todos os parâmetros analisados pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), do universo de amostras em estudo.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Influência da estrutura dos compostos fenólicos na diversidade das suas características organolépticas: 1. Procianidinas pouco polimerizadas; 2. Procianidinas oligoméricas; 3. Procianidinas polimerizadas; 4. Antocianinas; 5. Taninos dos engaços (Glories, 1994, não publicado).	19
Figura 2 – Processo de síntese de compostos fenólicos derivado do ácido shiquímico (Castro, 2014).....	20
Figura 3 – Estrutura química do ácido benzóico e do ácido cinâmico (Cabrita, 2004).	22
Figura 4 – Formulas gerais dos flavonóis (Cabrita <i>et al.</i> , 2003).	24
Figura 5 – Estrutura dos 3-flavanóis (Cabrita <i>et al.</i> , 2003).	24
Figura 6 – Estrutura e classificação das Antocianinas (Jakson, 2008).	26
Figura 7 – Fases de crescimento do bago e acumulação de compostos (Magalhães, 2008; adaptado de Fregoni, 1999).	28
Figura 8 – Esquema da transmissão da luz por uma amostra (Raccagni, 2011). .	36
Figura 9 – Refletância difusa pela passagem da luz por uma amostra (Maselli, 2014).	37
Figura 10 – Equipamento MT00 da Maselli Misure (Maselli, 2014).	39
Figura 11 – Gammas de comprimentos de onda analisadas pelo MT00 (Raccagni, 2011).	39
Figura 12 – Exemplo de visualização de uma curva de maturação de uma parcela, com os parâmetros: índice de polifenóis total (IPT) e as antocianinas totais (AT) (http://www.maselli.com , 2014).	41

Figura 13 – Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Lambda 25 (foto de Pedro Correia, 2013).....	46
Figura 14 – Equipamento Winescan FT120 (foto de Pedro Correia, 2013).....	48
Figura 15 – Equipamento MT00 (Masselli, 2014).....	49
Figura 16 – Equipamento MT 00 com o triturador (Maselli, 2014).....	50
Figura 17 – Gráfico de valores de antocianinas totais obtidos pela metodologia de bancada método Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.....	53
Figura 18 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas totais obtidos pela metodologia de bancada Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.....	54
Figura 19 – Gráfico de valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.....	55
Figura 20 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia de bancada (Glories, 1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.	56
Figura 21 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.	56
Figura 22 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990), em mg/L.	57
Figura 23 – Gráfico de correlação entre valores de Índice de Polifenóis Totais obtidos pela metodologia de bancada (Glories, 1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02).	58
Figura 24 – Gráfico de correlação entre valores de Índice de Polifenóis Totais obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02).	58
Figura 25 – Gráfico de correlação entre valores de Extratibilidade das Antocianinas obtidos pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em percentagem.	59

Figura 26 – Gráfico de valores de MP (%) - contribuição dos taninos das grainhas, de várias amostras de uva..... 60

CAPITULO 1 | INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

1.2. OBJETIVOS E SÍNTESE DA METODOLOGIA DE TRABALHO

1.3. CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA

1.4. ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

1.1. Introdução

Já foi detetada a ocorrência de mais de 8000 compostos fenólicos em plantas (Dreosti, 2000), sendo estes, os seus metabolitos secundários mais abundantes.

Este vasto e complexo grupo faz parte dos constituintes de muitas variedades de vegetais, frutas e produtos industrializados como o chocolate, o chá e o vinho.

Os compostos fenólicos possuem grande importância no mundo da enologia, pois a qualidade do vinho deriva, direta ou indiretamente, da quantidade e estrutura destes compostos, pois contribuem para o seu sabor e aroma (Mamede, 2005).

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. Assim, os compostos fenólicos revestem-se de fundamental importância nas características dos vinhos (Cabrita, *et al.*, 2003).

A quantidade destes compostos nos vinhos varia de acordo com alguns fatores, como: clima, natureza do solo, variedade da uva, maturação da uva, maceração da uva, temperatura de fermentação, pH, dióxido de enxofre e etanol (Teissedre, 1995).

O processo de maturação das uvas inclui um conjunto de reações físicas e bioquímicas, que começa no pintor e acaba com a uva madura, ou seja, quando esta atinge o potencial máximo de cada componente, para ser sujeita a transformações enológicas ou consumo (Palacios, 1986; González-Sanjosé, 1991). As transformações que ocorrem nas uvas durante a maturação não ocorrem simultaneamente. De forma geral podemos distinguir vários estados diferentes de ótimos de maturação que não costumam coincidir no tempo, como; maturação fisiológica, aquando da germinação; industrial, quando a uva atinge maior peso e concentração em açúcar sem decréscimo dos ácidos; e tecnológica, quando atinge as características ótimas para o seu destino final tendo em conta o tipo de vinho que se deseja produzir (Robredo, 1991; Perez-Magariño, 2006).

A maturação fenólica compreende não somente a concentração total de fenóis, mas também a sua estrutura e a sua capacidade de serem extraídos das uvas durante o processo de elaboração do vinho (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006), podendo ser estimada através do potencial fenólico da uva.

Teoricamente, sobre condições de vinificação comparáveis, por exemplo, uvas com alto teor de antocianinas deveriam produzir vinhos com mais cor, mas nem sempre se verifica o resultado esperado. Este facto é explicado pela variação do potencial de extração ou extratibilidade dos compostos fenólicos, que variam de acordo com as condições de amadurecimento das uvas e potencial genético das diferentes castas. Dessa forma, a maturação fenólica corresponde à combinação entre um alto potencial de pigmentação aliado a uma boa capacidade de libertar esses compostos nos vinhos (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Assim, na produção de vinhos tintos é necessário ter em conta a maturação fenólica das uvas, através da determinação da concentração de compostos fenólicos, bem como a sua extratibilidade durante a vinificação (Segade, 2008), já que são estes compostos que conferem ao vinho atributos sensoriais como a estrutura, acidez, adstringência e cor (Escribano-Bailon, 2001), o que permite ao enólogo explorar o máximo potencial da uva.

A maturação tecnológica, aromática e fenólica são variáveis independentes e todas devem ser tidas em conta para chegar a uma conclusão sobre o melhor momento para vindimar, conseguindo assim, a maior qualidade possível do vinho a produzir (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

1.2. Objetivos e síntese da metodologia de trabalho

O trabalho apresentado nesta dissertação pretende dar um contributo na comparação de metodologias de avaliação de parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas tintas, ferramenta determinante na ajuda à decisão de vindima.

Pretende-se, neste contexto de maturação fenólica das uvas, avaliar a quantidade de antocianinas totais e extraíveis, o índice de polifenóis totais, a tonalidade e intensidade da cor das uvas, com recurso a uma nova metodologia, a espectrofotometria de refletância difusa, e pelos tradicionais métodos de bancada e métodos baseados em espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier (FTIR).

Os parâmetros de cor obtidos através das 3 metodologias serão comparados por forma a se tentar compreender as vantagens e desvantagens da metodologia de refletância difusa, que é uma nova metodologia para a qual se carece de informação.

Assim, foram analisadas e caracterizadas mais de 100 amostras de uva durante a campanha de vindima do ano 2012, entre os dias 11 de Setembro e 26 de Setembro. As amostras foram colhidas dos reboques de uva entregues pelos associados da CARMIM - Cooperativa Agrícola de Reguengos de Monsaraz, imediatamente antes da descarga nos tegões, tendo-se privilegiado a heterogeneidade entre amostras, no sentido de obter um largo espectro de estados de maturação fenólica das uvas e conseqüente, maior robustez aquando da comparação dos parâmetros analisados pelas três metodologias.

Para além, da análise aos compostos fenólicos das uvas pelas diferentes metodologias, todas as amostras foram caracterizadas quanto a álcool provável, pH e acidez total.

No âmbito deste trabalho não foi possível analisar os compostos de cor presentes nos vinhos resultantes das uvas analisadas, contudo, seria muito interessante compará-los com o valores obtidos na avaliação fenólica da uva, de forma equacionar o potencial fenólico dos vinhos à vindima, pela análise à uva e segundo determinada metodologia de vinificação.

1.3. Contribuição Científica

A principal contribuição deste estudo centra-se na avaliação da metodologia de refletância difusa, para análise dos compostos fenólicos ao longo da maturação da uva, pela comparação com os tradicionais métodos de bancada e métodos baseados em espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier (FTIR).

Esta metodologia apresenta um elevado potencial no apoio à tomada de decisão de vindima pelo enólogo, pois permite a caracterização fenólica de uma amostragem de uva de forma expedita e rápida.

1.4. Organização e Estrutura da tese

Feita a caracterização do tema em estudo, no presente capítulo, esta dissertação é composta por mais três capítulos. No segundo capítulo é efetuado um enquadramento teórico sobre os compostos fenólicos, a maturação fenólica das uvas, e sobre as metodologias para determinação dos compostos fenólicos, para elucidar o leitor menos familiarizado com estas temáticas. No terceiro capítulo apresentam-se as metodologias aplicadas neste estudo, pela descrição das diferentes técnicas de análise dos compostos fenólicos das uvas e análise de bancada de outros parâmetros analíticos das uvas, como sendo, teor em açúcar, acidez total e pH.

Os resultados obtidos pelas diversas metodologias e análises são também apresentados neste capítulo, embora sejam apenas discutidos no capítulo seguinte (capítulo quatro).

Finalmente, no capítulo quatro tecem-se algumas considerações sobre os métodos utilizados e os resultados obtidos, bem como se apresentam algumas recomendações para trabalhos futuros, com vista ao aperfeiçoamento da metodologia aqui aplicada.

CAPITULO 2 | REVISÃO DO CONHECIMENTO

2.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

2.1.1. COMPOSTOS DE NATUREZA NÃO FLAVONÓIDE

2.1.2. COMPOSTOS DE NATUREZA FLAVONÓIDE

2.1.2.1. ANTOCIANINAS

2.2. A MATURAÇÃO DA UVA

2.2.1. EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE

2.3.1. METODOLOGIA CLÁSSICA

2.3.2. FTIR

2.3.3. REFLETÂNCIA DIFUSA

2.3.3.1. EQUIPAMENTO MT00 (MASELLI MISURE)

2.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos possuem uma grande importância em enologia devido ao papel que desempenham, direta ou indiretamente, sobre a qualidade dos vinhos (Flanzy, 2000). São substâncias que possuem um papel determinante na bioquímica da planta, com funções variadas desde a cor das flores e frutos, até à impregnação de lenhina das paredes pecto-celulósicas. Em viticultura a sua importância é capital, não apenas devido ao papel sobre a coloração dos frutos, mas sobretudo pelas particularidades gustativas que conferem ao mosto e vinho (Champagnol, 1984), como representado na figura 1.

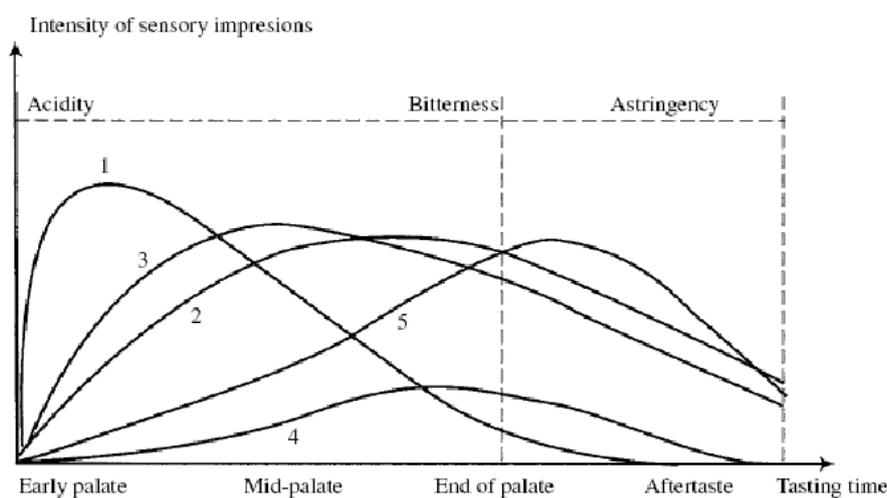


Figura 1 – Influência da estrutura dos compostos fenólicos na diversidade das suas características organolépticas: 1. Procianidinas pouco polimerizadas; 2. Procianidinas oligoméricas; 3. Procianidinas polimerizadas; 4. Antocianinas; 5. Taninos dos engaços (Glories, 1994, não publicado).

Do ponto de vista fisiológico, os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, caracterizados por conter um grupo fenol num anel aromático, que embora possuam grupos álcool, não exibem as suas propriedades (Taiz & Zeiger, 2004; Jackson, 2008).

A síntese destes compostos em *Vitis vinífera*, tem origem principalmente, na via do ácido shiquímico ou em biossíntese mista (Figura 2) (Conde et al., 2007).

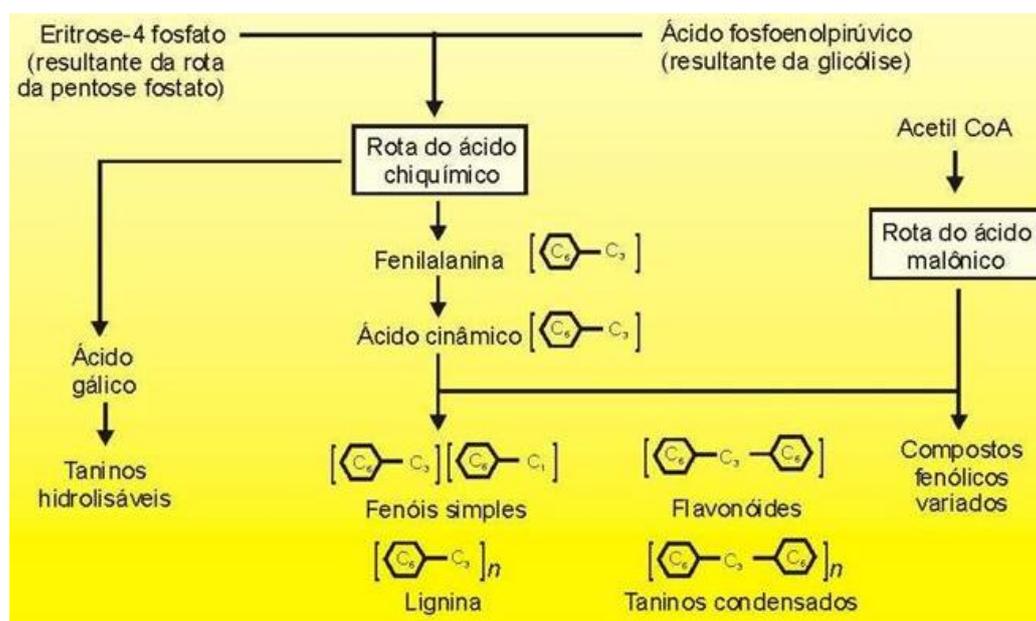


Figura 2 – Processo de síntese de compostos fenólicos derivado do ácido shiquímico (Castro, 2014).

Segundo Deloire *et al.* (1998), a videira produz os polifenóis como defesa a situações adversas ou ao stresse, como quando a planta é submetida ao ataque de agentes patogénicos, ou a um stresse abiótico (deficit hídrico, radiação ultravioleta).

Os compostos fenólicos são encontrados, principalmente, nas camadas internas da película e da grainha, enquanto que na polpa, a sua concentração é muito baixa, no entanto estes valores dependem muito da casta e dos fatores ambientais (Perez-Magariño, 2006). Estes compostos existem em estruturas insolúveis como vacúolos das células das plantas, em vesículas de lipoproteínas, ou adsorvidos ou unidos a polissacáridos nos vasos fibrovasculares, o que complica a sua extração (Corrales, 2008).

Os polifenóis presentes nas uvas e nos vinhos podem subdividir-se em dois grandes grupos, os não flavonóides e flavonóides. Os primeiros são caracterizados por se apresentarem sob a forma de ácidos (Jackson, 2008), sendo os mais comuns nas uvas, os ácidos fenólicos, cinâmicos, benzóicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos (Macheix, 1990). No caso dos flavonóides as classes mais abundantes são as flavanas, os flavanóis e as antocianinas, sendo que estas últimas, como referido, apenas estão presentes nas uvas e vinhos tintos (Corrales, 2009).

Os compostos fenólicos distribuem-se de modo desigual pelas diversas partes do fruto, sendo que nas grainhas existem flavanóis e ácido gálico; na polpa, ácidos hidroxicinamil tartáricos; nos vasos fibrovasculares, flavanóis e ácidos fenólicos do tipo benzoico e na película, todos os anteriores e ainda flavonóis e antocianinas (Cabrita, *et al.*, 2003).

A sua concentração aumenta continuamente desde o início do desenvolvimento da uva, contudo, o maior aumento verifica-se no início do desenvolvimento dos bagos, sendo que a acumulação durante a maturação é mais lenta (Pinto, 2002).

Várias são as enzimas que participam em reações metabólicas e influem na síntese de compostos fenólicos, como a fenilalanina-amoniaco-liase e a chalcona sintetase. A primeira localiza-se nas células epidérmicas do bago de uva e nas grainhas, apresenta um máximo de atividade na fase de crescimento herbáceo do bago, decrescendo a sua atividade até ao pintor, sendo que ao longo da maturação apresenta uma atividade muito baixa (Ribéreau-Gayon *et al*, 2006). Nas castas tintas a atividade desta enzima aumenta de novo no pintor e existe uma forte relação entre a sua atividade e a intensidade da cor dos mostos.

2.1.1. Compostos de natureza não flavonóide

Como referido, os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, cinâmicos, benzóicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos.

Estes compostos, no que refere às suas estruturas químicas, segundo Melo & Guerra (2002), são classificados da seguinte forma:

- os derivados das estruturas químicas C_6-C_1 , específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C_6-C_3 , específicas dos ácidos cafeico e p-cumárico; ou então dos ácidos hidroxicinamil tartáricos como o ácido fertárico e coutárico;
- os derivados das estruturas químicas $C_6-C_2-C_6$, específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo.

Os compostos não flavonóides encontram-se em baixas concentrações nas uvas e nos vinhos, com exceção dos ácidos fenólicos (hidroxicinâmico e benzoico), que

representam a terceira classe de compostos fenólicos mais abundantes nas uvas, depois de taninos e antocianinas (Kennedy *et al.*, 2006).

A uva e o vinho contêm ácidos benzóicos e cinâmicos, sendo que a concentração nos vinhos tintos é de 100 a 200 mg/L. Os ácidos fenólicos são constituídos por apenas um anel benzênico na molécula, são incolores em solução hidroalcoólica, mas podem tornar-se amarelos depois da oxidação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Representados na Figura 3, estes ácidos estão presentes nos vacúolos das células da película e da polpa, sob a forma de ésteres tartáricos.

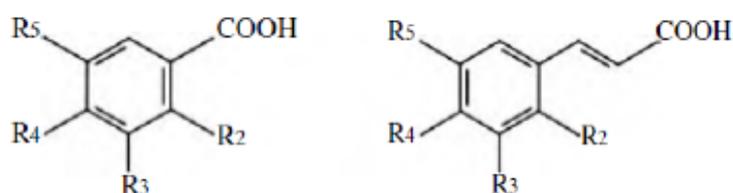


Figura 3 – Estrutura química do ácido benzóico e do ácido cinâmico (Cabrita, 2004).

O ácido hidroxicinâmico e seus derivados como *p*-cumárico, caféico, ferrúlico e sinápico são originados do metabolismo da fenilalanina ou tirosina (Riceevans *et al.*, 1996), geralmente, estes ácidos encontram-se esterificados.

Os ácidos hidroxicinâmicos, ainda que não exerçam qualquer influência no gosto dos vinhos, estão envolvidos no processo de aparecimento de fenóis voláteis e consequentes alterações aromáticas, nomeadamente, nos aromas primários desenvolvidos durante a maturação das uvas (Garcia *et al.*, 2003).

Os ácidos derivados do ácido benzóico sofrem substituições nas posições meta e para, dando origem, por exemplo, ao ácido gálico. Alguns vinhos que sofrem envelhecimento em barrica apresentam altos teores de ácido gálico.

Os compostos não flavonóides são os principais compostos fenólicos dos vinhos brancos. Estes compostos jogam um papel importante nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos (Singleton, 1987).

Os estilbenos, apesar de se apresentarem em quantidades mínimas nos vinhos, têm grande importância devido aos benefícios que trazem a saúde humana. Destaca-se neste grupo, o resveratrol, por ser o principal estilbeno produzido nas uvas (Conde *et al.*, 2007), concentrando-se na película dos bagos, e sintetizado principalmente em resposta ao ataque de patógenos e ao stresse abiótico.

A atividade antioxidante dos não-flavonóides está relacionada com a posição dos grupos hidróxilo e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ com o grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil maior será a capacidade antioxidante do grupo hidróxilo na posição meta (Mamede *et al.*, 2005).

2.1.2. Compostos de natureza flavonóide

Os flavonóides, dividem-se em flavonóis, flavanóis e antocianinas, e são compostos polifenólicos que apresentam estrutura química de 15 átomos de carbono, ou seja, 2 anéis de benzeno (anéis A e B) ligados por um grupo pirano (anel C), cuja representação da fórmula é $C_6-C_3-C_6$ (Herrmann, 1976 cit. por Mamede, 2004).

Esta classe de compostos pode ser dividida em famílias, as quais se distinguem pelo grau de oxidação do anel central (Cabrita *et al.*, 2003).

A estrutura química dos flavonóides favorece a sua ação antioxidante. Os hidrogénios dos grupos hidroxilo adjacentes, localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzénicos e a dupla ligação da função carbonilo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonóides, fornecem a estes compostos, uma alta atividade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Os compostos fenólicos são encontrados, principalmente, nas camadas internas da película e da grainha, sendo que na polpa as suas concentrações são muito baixas, no entanto estes valores dependem muito da casta e dos fatores ambientais (Perez-Magariño, 2006).

Nas uvas, os flavonoides são sintetizados no retículo endoplasmático e de seguida são deslocados e armazenados nos vacúolos das células produtoras e em vesículas de lipoproteínas, o que complica a sua extração (Corrales, 2008).

Os principais flavonóis da uva são a quercetina, o campferol e a miricetina (Figura 4), sendo que estes compostos são caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3 (Mattivi *et al.*, 2006). A síntese de flavonóis ocorre na película do bago, praticamente durante todo o crescimento do bago. Embora seja uma família minoritária nas uvas, os flavonóis têm um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de

processos de co-pigmentação com as antocianinas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) (Cabrita *et al.*, 2003).

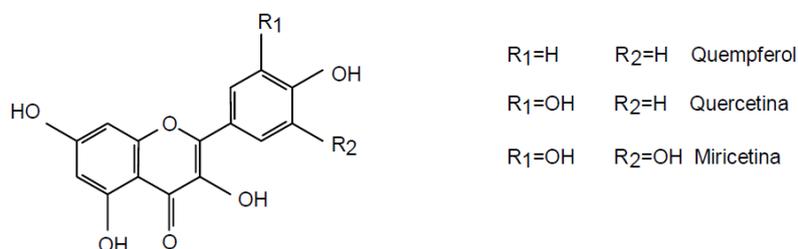


Figura 4 – Formulas gerais dos flavonóis (Cabrita *et al.*, 2003).

Os flavanóis presentes nas uvas são representados principalmente por 3-flavanóis e taninos ou proantocianidinas. Os primeiros caracterizam-se por possuir um anel heterocíclico saturado, sendo estes os monómeros responsáveis pelo sabor amargo dos vinhos. As suas formas mais encontradas nas uvas e nos vinhos são a (+)-catequinas, (-)-epicatequinas (Figura 5) (Su *et al.*, 1969).

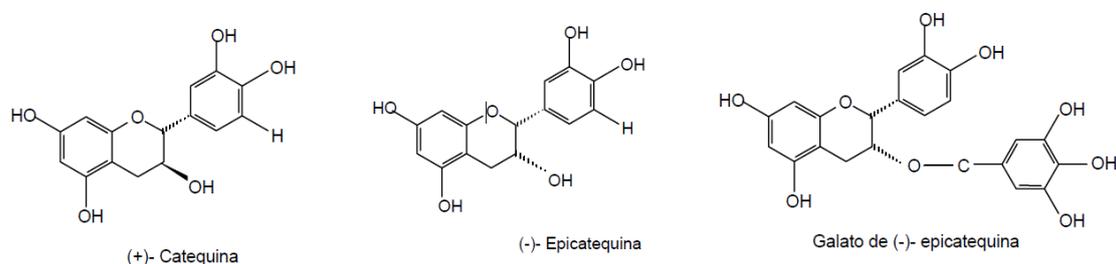


Figura 5 – Estrutura dos 3-flavanóis (Cabrita *et al.*, 2003).

Os taninos podem ser divididos em dois grandes grupos, os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis não existem naturalmente na uva, assim são adicionados ao vinho, quer seja por contato com materiais vegetais, como a madeira de carvalho das barricas; quer por adição de produtos enológicos com taninos comerciais (Ferreira, 2006 cit. por Tomaz, 2013).

Os taninos condensados são responsáveis pelas características organolépticas das uvas e vinhos, como resultado das suas propriedades tânicas, que dependem da sua estrutura e do seu grau de polimerização (Freitas, 1998).

Os taninos condensados estão presentes em todas as partes sólidas do cacho (películas, grainhas e engaços) e solubilizam-se no vinho durante a maceração. O seu teor no vinho tinto depende da variedade e das condições de vinificação, variando de 1 a 4 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Os taninos, também denominados de proantocianidinas são compostos que libertam antocianidinas quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a rutura das ligações entre as unidades monoméricas. Consoante se liberte cianidina ou delfinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. As primeiras são polímeros de catequina e epicatequina e as segundas são constituídas por galocatequinas e epigalocatequinas (Cabrita *et al.*, 2003).

As proantocianidinas são assim, polímeros de moléculas de 3-flavanóis, e consoante o número de vezes que esta unidade se repete, assim as proantocianidinas podem ser dímeras, trímeras, oligoméricas ou polímeros.

Estes compostos são extraídos das películas, grainhas e dos engaços das uvas e conferem a adstringência aos vinhos, daí a existência de teores mais elevados nos vinhos tintos que nos vinhos brancos, pois a maceração das partes sólidas aquando da fermentação dos vinhos tintos, permite a extração destes compostos para o mosto.

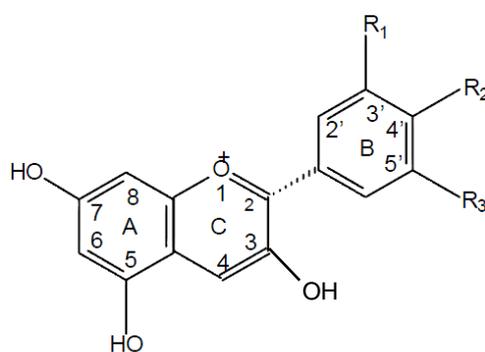
Os teores de proantocianidinas nas uvas, como os restantes compostos fenólicos, variam com o tipo de solo, o ano de colheita, de casta para casta, as condições climatéricas, a forma de condução das cepas.

2.1.2.1. Antocianinas

O termo antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro). Depois da clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal (Harborne *et al.*, 1988).

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica.

A estrutura química básica das antocianinas é baseada numa estrutura policíclica de quinze carbonos, representada na Figura 6 (López *et al.*, 2000).



Antocianidinas	R ₁	R ₂	R ₃
Cianidina	OH	OH	-
Peonidina	OCH ₃	OH	-
Delfinidina	OH	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃
Petunidina	OCH ₃	OH	OH

Figura 6 – Estrutura e classificação das Antocianidinas (adaptado de Jakson, 2008).

As antocianinas estão entre os mais importantes flavonoides das uvas tintas. São responsáveis pela cor de vinhos tintos e estão localizadas nas paredes espessas de células hipodérmicas das películas dos bagos de uva (Conde *et al.*, 2007).

A sua estrutura difere dos restantes flavonoides por ser complementada por uma ou mais moléculas de glucose. Estruturalmente são glucósidos de polihidroxi ou polimetoxi dos sais de flavilium (2-fenil-benzopirilo). Elas diferenciam-se pelo número de grupos hidroxí (oxidrílo) 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 (Guerra, 1997 cit. por Cabrita *et al.*, 2003).

As antocianinas na forma de heterósidos (antocianinas), são muito mais estáveis do que na forma aglicona (antocianidinas).

As antocianinas do género *Vitis* são a cianidina, a delfinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina. As suas quantidades relativas variam com a casta, mas a malvidina é sempre maioritária.

A malvidina é a molécula dominante em todas as variedades, representando de 50 a 80% do total na uva madura. Das antocianinas restantes, temos 5 a 10% de cianidina, 10 a 20% de delfinidina, 15 a 25% de petunidina e 15 a 30% de paeonidina (Guerra, 1998).

A cor das antocianinas varia com as condições do meio e com as suas estruturas químicas, variando do rosa ao azul, com o aumento dos grupos hidroxilo e o efeito inverso observa-se quando se substituem estes grupos por grupos metoxi.

Em soluções aquosas, as antocianinas apresentam diferentes estruturas em função do pH. De modo geral, um meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), as antocianinas apresentam coloração intensamente vermelhada, devido ao predomínio da forma catiónica flavílica (AH^+). Para um meio com pH maior que 2, é observado um equilíbrio entre o catião flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase cabinol (B).com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até ser tornarem praticamente incolores em pH cerca de 6 (Março, 2008).

2.2. A maturação da uva

O conceito de maturação depende não só do grau ou estado de acumulação dos compostos químicos da uva e do volume do bago, mas também dos objetivos a dar à produção: uva de mesa, uva-passa, ou uva para vinho, e, dentre estes, quais os tipos e níveis de características qualitativas.

Segundo Magalhães (2008), podem considerar-se três definições de maturação. A maturação fisiológica, que corresponde à maturação completa da grainha e sua capacidade germinativa posterior; a maturação industrial, traduzida pelo valor máximo da relação entre açucares acumulados no bago e a acidez total; e a maturação tecnológica, que diz respeito ao momento ótimo de vindima, em função do destino pretendido, pelo que nem sempre corresponde à fisiológica ou à industrial.

O crescimento do bago, processa-se, desde o vingamento à maturação. O bago apresenta uma curva de crescimento sigmoidal dupla (aumento do peso, do volume e do diâmetro), a que corresponde duas fases (fase I e III) separadas por uma fase de paragem ou de desenvolvimento muito lento (fase II ou fase lag) (Dokoozlian, 2000).

Na primeira fase (fase I), que decorre entre o vingamento e o pintor, o bago apresenta elevada dureza, cor verde devido à presença de clorofila e o seu crescimento deve-se à divisão e expansão celular. Durante esta fase, dá-se o desenvolvimento das sementes e a síntese de ácidos orgânicos e ficam definidos o

número de células e a capacidade de distensão das suas paredes e, conseqüentemente, a dimensão potencial do bago e a produção à vindima (Lissarrague *et al.*, 2007). Designada também de fase herbácea, tem uma duração de cerca de 5 a 6 semanas, em função das características das castas, do seu grau de precocidade e valores de temperatura, o que para as nossas condições, corresponde ao período compreendido entre meados de julho a inícios de agosto (Reynier, 1986).

Na segunda fase de crescimento (fase III), que se inicia com o pintor, o bago perde rigidez, perde clorofila e, no caso de castas tintas, inicia a pigmentação da película. Durante esta fase dá-se a acumulação de açúcares, dos componentes da cor e dos aromas, a concentração em ácidos orgânicos decresce e o seu crescimento é apenas resultante do alargamento celular.

Na figura 7 estão representadas as fases de crescimento do bago ao longo do ciclo de maturação.

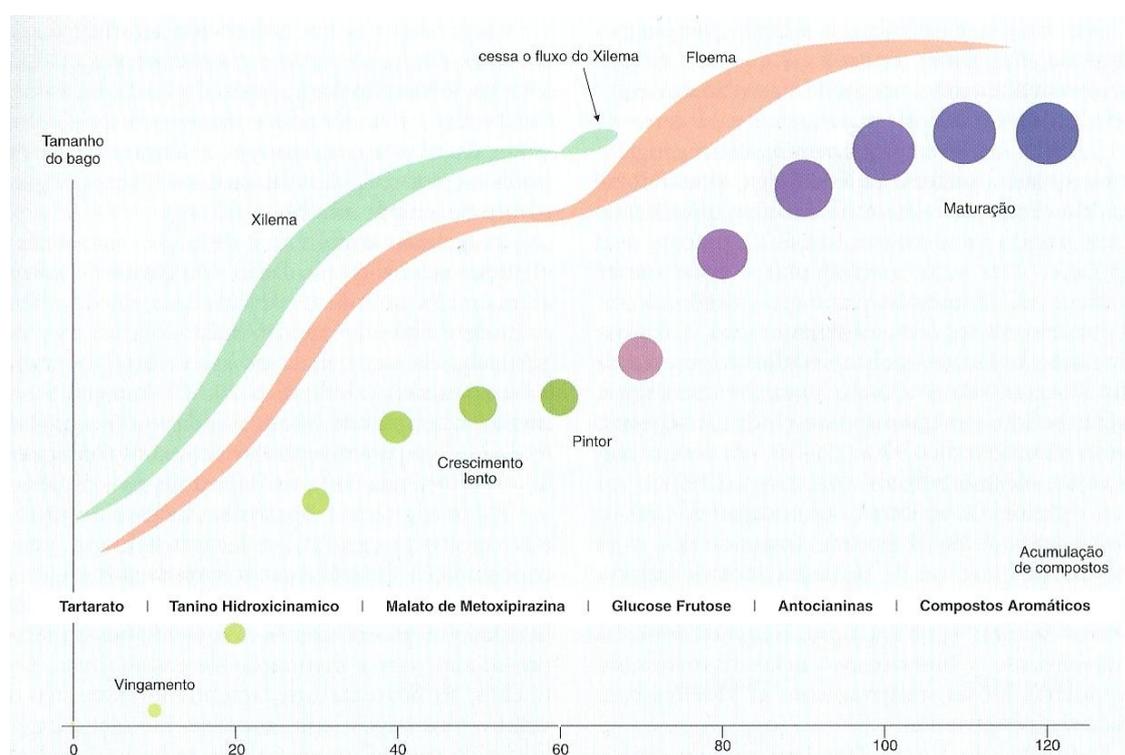


Figura 7 – Fases de crescimento do bago e acumulação de compostos (Magalhães, 2008; adaptado de Fregoni, 1999).

2.2.1 Evolução dos Compostos Fenólicos

A síntese das antocianinas começa no pintor e vão-se acumulando ao longo da maturação da uva (Perez-Magarino, 2004). No pintor as antocianinas aparecem sob a forma de monoglicosido e respetivos esteres, principalmente com o ácido acético, ácido cafeico e ácido p-cumárico, e a esta acumulação deve-se o aparecimento da cor tinta nas uvas (Kelebek, 2006).

A evolução do conteúdo antociânico é caracterizada por 3 fases (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006): na primeira fase o nível de antocianinas apresenta um ligeiro aumento, na segunda fase um aumento de antocianinas e na terceira fase em que se observa uma estabilização seguida de decréscimo até ao fim da maturação tecnológica.

A taxa de acumulação de antocianinas tem sido relacionado com várias condições agro-ambientais, tais como, a cultivar, o clima, as condições do solo, condições de rega e práticas culturais, no entanto pode ocorrer um decréscimo destas mesmo antes da vindima e/ou durante a sobrematuração (Río Segade, 2008).

A temperatura tem demonstrado ter um papel direto e importante na formação dos compostos fenólicos, nomeadamente, das antocianinas (Huglin & Schneider, 1998).

Em zonas frias e de fraca insolação (latitudes e/ou altitudes elevadas), é menor a concentração de antocianinas, sendo aquelas geralmente desfavoráveis à produção de vinhos tintos de grande qualidade. Por outro lado, temperaturas elevadas, até 35° C, e grandes amplitudes térmicas diurnas (dias quentes, noites frias) são favoráveis à síntese de antocianinas, originando vinhos com mais cor (Magalhães, 2008).

Enquanto temperaturas baixas (14 - 9° C dia e noite, respetivamente) não conduzem a grandes concentrações de antocianinas (Combe, 1987), temperaturas a partir de 30° C também tem como efeito a diminuição da síntese de antocianinas (Tarara *et al.*, 2008), podendo mesmo chegar a ser uma inibição completa e irreversível quando se atingem temperaturas muito elevadas.

Existem estudos que defendem que em climas quentes, o bago pode chegar a temperaturas demasiado altas que inibem a formação de antocianinas e portanto reduz a cor da uva (Downey *et al.*, 2006).

A radiação solar é o fator que mais influencia a biossíntese e acumulação de antocianinas (Mazza & Miniati, 1993). Segundo este autor, a redução da exposição da videira a radiação solar provoca uma diminuição do nível de antocianinas nos bagos. Confirma Reynier (1986) quando cita Glories(1676) que refere que as temperaturas elevadas exercem um efeito negativo sobre a coloração dos bagos, contudo, pelo contrário, a iluminação direta dos cachos é favorável.

Vários estudos foram efetuados com o objetivo de avaliar a influência do stress hídrico na acumulação de compostos fenólicos. Matthews e Anderson (1988) registaram maior concentração de polifenóis totais e antocianinas totais nos bagos da casta “Cabernet Franc” em plantas sujeitas a rega deficitária ao longo de todo o ciclo e em plantas na qual a rega foi interrompida antes ou depois do pintor do que nas plantas mantidas em conforto hídrico durante todo o ciclo.

Refere Magalhães (2008) que práticas culturais que conduzam a um vigor excessivo são desfavoráveis à síntese de antocianinas, pois os fotoassimilados dirigem-se preferencialmente para a síntese proteica, em detrimento da dos açúcares. Assim, solos profundos e ricos, excesso de adubação azotada e mal localizada no ciclo vegetativo, rega abundante no período de maturação, o excesso de folhagem que dificulta a penetração da luz no interior da copa, são fatores que não abonam na síntese de antocianinas.

Confirma Ojeda *et al.* (2002) quando refere que a acumulação de antocianinas nos bagos é determinada por fatores climáticos, nomeadamente, a temperatura e a radiação, pelas características do solo, pela disponibilidade em azoto e pelas operações de manejo da sebe, com sejam o sistema de condução e a desfolha.

De forma geral, ao longo da maturação, na grainha, o teor de taninos extraíveis vai diminuindo, tornando o mosto menos herbáceo e adstringente, enquanto na película aumentam os polifenóis.

A intensidade corante depende não só do teor em antocianinas e do grau da sua extratibilidade, mas também dos taninos e pH do mosto. Também a extração das antocianinas é devida, em parte, à quantidade de moléculas biossintetizadas nas células peliculares (associadas às características do "terroir"), mas sobretudo ao estado de degradação das células à maturação, sob ação enzimática (característica da casta) (Gaulejac *et al.*, 1998).

A difusão dos constituintes fenólicos para o mosto em fermentação depende da solubilidade e localização destes no bago da uva. Esta difusão é igualmente

afetada por diversos fatores incluindo a temperatura, teor em etanol e dióxido de enxofre. As antocianinas localizadas nas películas e polpa de variedades tintureiras, são extraídas rapidamente, atingindo a sua concentração máxima após alguns dias e diminui lentamente enquanto a extração dos taninos continua (Cheynier, 2003).

A análise da maturação fenólica é baseada na evolução dos compostos fenólicos presentes nas películas e nas grainhas da uva. Considera-se que a uva está madura quando a extratibilidade dos taninos das sementes diminui, a concentração das antocianinas e taninos da película aumenta e a degradação das paredes celulares da película facilita a extração destes compostos (Glories, 1991; Guerra, 2002).

O acompanhamento da maturação fenólica é útil para determinar a melhor época de colheita das uvas tintas, para testar a adaptação das variedades às diferentes regiões de cultivo e para adaptar as condições de vinificação à uva produzida, visando a elaboração de vinhos de qualidade.

2.3. Métodos de Análise

O momento ótimo de colheita da uva para vinificação depende de vários fatores, tradicionalmente, analisam-se o teor de açúcar, o pH e acidez total, para determinar a data de começo da vindima, o conjunto destes parâmetros caracterizam a maturação tecnológica da uva. Contudo, para além dos referidos, existem mais parâmetros qualitativos que são determinantes para a produção de vinhos de alto padrão de qualidade, como sendo o teor de compostos fenólicos, caracterizando estes, a maturação fenólica da uva.

O acompanhamento da maturação fenólica das uvas e o conhecimento dos teores de compostos fenólicos são elementos essenciais para a gestão da vindima, pois permitem apontar a data ótima de colheita da uva, e na adega, definir protocolos de vinificação diferenciados, de forma de adequar a tecnologia de vinificação (González-Sanjosé *et al.*, 1991), como sendo, a duração de macerações, a intensidade e a frequência de remontagens, as temperaturas de maceração e de fermentação, etc.; tendo em vista um determinado perfil de vinho (González-Neves *et al.*, 2007).

Vários são os métodos de avaliação do conteúdo das uvas em compostos fenólicos que têm sido sugeridos por diversos autores, sendo utilizados para determinar o teor de antocianinas e taninos, de forma a estimar o potencial enológico das uvas.

Este trabalho realizou-se no contexto da comparação de três metodologias de avaliação da maturação fenólica de uvas, os quais se introduzem nos pontos seguintes.

2.3.1. Metodologia clássica

De acordo com Bautista-Órtin (2005), várias metodologias foram desenvolvidas na tentativa de estimar a maturação fenólica das uvas, sendo que o método mais utilizado é o desenvolvido por Glories (1990) e descrito por Saint-Cricq *et al.* (1998), também referido por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006).

Esta metodologia sugere uma comparação entre os extratos obtidos após um processo de maceração dos bagos de uva triturados, em duas soluções: uma com valor de pH de 1,0 e outra com pH de 3,2. Tratam-se de soluções aquosas acidificadas, a pH 1 (HCl N / 10) e pH 3,2 (solução de ácido tartárico a 5g / l neutralizado).

O princípio deste método consiste em extrair, rapidamente, as antocianinas das películas dos bagos de uva, gentilmente em primeiro lugar e, em seguida, sob condições mais extremas. A acidez é utilizada como um vetor, para facilitar a extração.

É recomendado um procedimento de trituração grosseira das uvas, e o preparado resultante deve ser diluído pela metade, com ambas as soluções, uma com valor de pH de 1,0 e outra com pH de 3,2. O esmagamento das grainhas, também contribui para a extração parcial dos seus taninos.

A partir das duas macerações das uvas inteiras trituradas, realizadas durante 4 horas, após filtração, pode ser determinado o teor de polifenóis com base na medição da absorvância a 280 nm (IPT) da amostra a pH 3,2, como descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), enquanto que as antocianinas podem ser quantificadas aplicando o método da descoloração pelo ião bissulfito, também descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006).

O meio ácido, pH 1, promove o rompimento da membrana celular (próteofosfolipídica) quebrando as ligações com as proteínas e, conseqüentemente, libertando o conteúdo dos vacúolos. Todas as antocianinas são, então, extraídas e solubilizadas na solução a pH 1.

A diluição das uvas trituradas com a solução a pH 3,2, promove uma extração de antocianinas que é, aproximadamente, comparável à que se realiza no processo de vinificação clássica de vinho tinto, em cubas de fermentação. Se a membrana celular não for porosa, as antocianinas são extraídas em pequena quantidade, contudo, se esta é quebrada por enzimas, então os pigmentos são libertados dos vacúolos e a extração tende a aproximar-se dos níveis descritos no caso anterior.

A diferença entre o teor de antocianinas nos dois extratos obtidos é uma indicação do estado de fragilidade das membranas das células das películas e, conseqüentemente, do seu estado de maturação, sendo que a fragmentação parcial das grainhas permite uma maior extração dos taninos.

A concentração de antocianinas é dada pela seguinte fórmula:

$$C \text{ (mg/l)} = \Delta d2 \times 875$$

Sendo $\Delta d2$, a diferença entre as Abs 520 nm das duas amostras (com e sem descoloração pelo ião bissulfito), para percurso ótico de 10 mm.

Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) destaca o facto de que as antocianinas e os taninos são extraídos da película sobre as mesmas condições, e que se um extrato com elevado conteúdo de antocianinas possui também, um elevado conteúdo em taninos, então as antocianinas podem ser consideradas como indicadores dos taninos nas películas.

Outros parâmetros podem ser calculados após o conhecimento do teor de polifenóis e de antocianinas de uma amostra, como o cálculo da extratibilidade das antocianinas (1) e a contribuição dos taninos provenientes das grainhas (2) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

$$(1) \text{ AE (\%)} = \frac{A_{\text{pH } 1,0} - A_{\text{pH } 3,2}}{A_{\text{pH } 1,0}} \times 100$$

$$(2) \text{ MP (\%)} = \frac{\text{Abs 280} - (\text{A pH 3,2} \times 40)}{\text{Abs 280}} \times 100$$

Onde A pH 1,0 e A pH 3,2 representam o teor em antocianinas totais dos respectivos extratos, a pH 1,0 e a pH 3,2, expresso em mg/L.

Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) refere que é conhecido que o valor de Abs. 280 para os extratos da película está correlacionado com a concentração de antocianinas por uma relação aproximada de Abs. 280 = A pH 3,2 x 40, sendo A pH 3,2 expresso em g/l. Assim, quanto maior o valor de MP, maior será a contribuição dos taninos das grainhas e maior o risco que estes compostos transmitam um efeito negativo ao sabor do vinho.

Os métodos para quantificação das antocianinas encontram-se bem elucidados na literatura. Uma maneira de se expressar os resultados da determinação de antocianinas é em termos da quantidade absoluta total de antocianinas presentes num extrato particular, estimando, dessa maneira, o teor de antocianina.

A grande maioria dos flavonóides absorvem luz na zona do espectro entre 350 e 380nm de comprimento de onda, enquanto que as antocianinas são capazes de absorver a luz, na zona do visível, compreendida entre os comprimentos de onda 496 e 550nm (Brouillard, 1982). Essa característica particular permite a quantificação das antocianinas por métodos espectrofotométricos em medições simples de absorvância em comprimentos de onda adequados (Wrolstad, 1976).

De acordo com González-Neves *et al.* (2003), a análise do potencial fenólico das uvas, de acordo com a metodologia descrita acima, pode ser uma excelente ferramenta para melhorar a gestão do processo de vinificação.

2.3.2. FTIR - Espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier

As espectroscopias no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) são técnicas de relevância cada vez maior em controlo de qualidade de processos e produtos industriais (Blanco *et al.*, 1998). Estas técnicas permitem a caracterização

qualitativa e quantitativa de amostras de materiais em processamento através do espectro de absorção nesta região do infravermelho.

Estes espectros possuem informação relacionada com a composição química e com as propriedades físicas da amostra, como a granulometria e a viscosidade (Blanco *et al.*, 1998).

A espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em enologia, deve ser baseada em calibrações analíticas específicas estabelecidas através da quantificação dos parâmetros a analisar, por métodos físico-químicos usuais. A calibração global desenvolvida para a análise de vinhos permite bons resultados para todos os parâmetros, conferindo alto grau de confiança à metodologia FTIR (Moreira *et al.*, 2002).

Estes mesmos autores referem que a metodologia de análise por FTIR não constitui um processo de análise absoluto. O valor analítico do parâmetro a determinar é obtido pela aplicação de um algoritmo em que são compensadas as contribuições de interferentes relativamente ao valor que adviria da avaliação direta das absorvâncias nos diversos comprimentos de onda.

O controlo da qualidade dos resultados é assegurado pela utilização da solução “zero” e de uma solução de equalização.

Esta tecnologia é uma forma eficiente de fazer medições espectrométricas usando luz infravermelha. Esta abordagem, ao contrário de métodos monocromáticos ou dispersivos, é vantajosa quanto à produtividade, à precisão e ao múltiplex necessários para as aplicações do usuário final.

Um interferómetro típico divide a luz infravermelha de uma fonte espectral em dois feixes, refletindo um feixe num espelho fixo e outro num espelho móvel. O espelho em movimento introduz um atraso de tempo que provoca uma mistura de interferências construtivas e destrutivas na recombinação dos feixes. A verificação deste sinal versus a posição do espelho produz um interferograma que pode ser convertido num espectro utilizando a transformada de Fourier.

A transformada de Fourier é utilizada como um método matemático para a criação, em série, da curva de expansão (interferograma). A transformada consiste na soma de senos e co-senos das distintas frequências óticas que compõem a radiação. Com a ajuda de um programa de computador, estes cálculos complexos, são calculados de forma rápida e exata.

Moreira *et al.* (2002), defendem que esta metodologia de análise está particularmente destinada às situações em que o prazo de resposta é crítico e a utilização de métodos oficiais não se torna imperativa. Defendem ainda a metodologia FTIR, ao nível da simplicidade de operação, da elevada cadência e dos baixos custos de análise e manutenção.

Rousseau *et al.* (2002), referem que as condições de armazenagem e de espera das amostras de uva para análise FTIR, podem provocar uma modificação dos parâmetros a analisar, particularmente nos indicadores de cor.

A metodologia FTIR é aprovada e apontada com grande fiabilidade por Dubernet (2000).

2.3.3 Refletância difusa

Os métodos de refletância (R) podem ser usados em amostras que são difíceis de analisar por métodos de transmitância.

Uma importante diferença entre a transmissão e a refletância dá-se devido ao diferente caminho ótico percorrido pela luz. Enquanto que na transmissão o caminho ótico é constante para todo número de onda, na refletância, o caminho pode ser variável, como elucidam abaixo as figuras 8 e 9.

Por exemplo, as bandas fracas no espectro por transmissão aparecerão mais fortes na refletância.

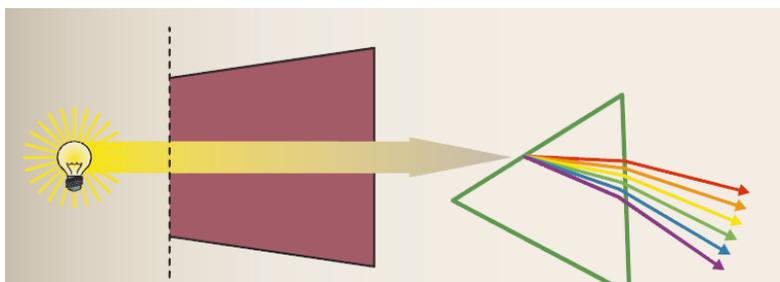


Figura 8 – Esquema da transmissão da luz por uma amostra (Raccagni, 2011).

Os métodos de refletância podem ser divididos em duas categorias: a refletância interna, que envolve uma célula de refletância total atenuada em contacto com a amostra, e a refletância externa que envolve um feixe de luz refletido diretamente

da superfície da amostra. Na refletância externa, a radiação, quando incide na amostra, pode ser refletida sob a forma de refletância especular ou difusa. A refletância é fortemente afetada pelas características físicas da amostra, tais como a granulometria e o grau de homogeneidade, assim como a forma e características superficiais das partículas, que influenciam de forma sistemática o espectro em toda a sua gama de comprimentos de onda (Osborne, 1993).

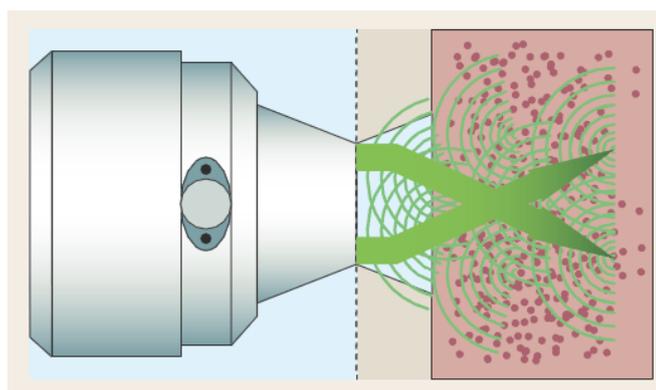


Figura 9 – Refletância difusa pela passagem da luz por uma amostra (Maselli, 2014).

A refletância especular ocorre quando o ângulo da radiação refletida iguala o respectivo ângulo de incidência. A intensidade da luz refletida depende do ângulo de incidência, do índice de refração do cristal, das características da superfície e das propriedades de absorção da amostra.

A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção e neste caso pode ocorrer severas distorções no espectro obtido (Ferrão, 2001).

A refletância difusa ocorre quando a luz incide na superfície de um material e é parcialmente refletida e transmitida em todas as direções (Figura 9).

A refletância difusa mede a razão entre a intensidade da luz refletida a partir da amostra, ou seja, a porção de radiação que penetra na superfície da amostra e não é absorvida, mas refletida, e a intensidade da luz incidente.

O caminho percorrido pela luz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, algumas das quais após percorrer o interior de partículas que constituem a amostra.

É recomendado que as dimensões das partículas das amostras sejam reduzidas, de modo a reduzir a quantidade de luz refletida em modo especular.

Nesta técnica, quando a radiação penetra na amostra, pode ser refletida da superfície de uma partícula ou ser transmitida através desta. A radiação refletida da superfície é tipicamente perdida. A radiação que passa através da partícula pode ser refletida na próxima partícula ou transmitida através desta. Este efeito de transmissão-reflexão pode ocorrer várias vezes na amostra. Assim, a radiação incidente é dispersa em todas as direções num largo ângulo. Por último, a energia da radiação dispersa é recebida num espelho esférico e reunida no detetor (Santos, 2007).

A interpretação de qualquer espectro é, essencialmente, um exercício de descoberta e entendimento de como interage a radiação eletromagnética com o material, a fim de se descobrirem informações ou propriedades relacionadas com a composição dos seus constituintes (Ferrão, 2001).

Esta tecnologia permite recolher informação mais completa sobre líquidos opacos com partículas em suspensão, tais como o mosto de uva triturado.

2.3.3.1. Equipamento MT00 (Maselli Misure)

Tendo por base a tecnologia de refletância difusa, a empresa Maselli Misure, desenvolveu o equipamento MT00, para análise de compostos fenólicos.

O componente de refletância difusa corresponde à luz que penetra no interior da amostra. Ela sofre absorção molecular e processos de refração, difração e de reflexão múltipla, resultando na dispersão em todas as direções, incluindo o seu retorno para o detetor de reflexão.

Este equipamento, por uma medição ótica, traduz a evolução da maturação fenólica diretamente a partir do sumo de uvas esmagadas, mosto.

As análises são feitas a partir de uma amostra de bagos de uva triturados por um misturador, fornecido junto com o equipamento, sendo que não necessitam de reagente químico e não há tempo de maceração.

O MT00 é um dispositivo dedicado aos laboratórios de enologia, pois, rapidamente, avalia as antocianinas, índice de polifenóis totais (IPT), a extratibilidade desses parâmetros da uva (determinação dos mesmos parâmetros que o método de Glories) e qualidade fenólica.

O espectrofotômetro para refletância difusa MT00 utiliza como fonte de luz os LED de comprimentos de onda específicos, selecionados por meio de filtros de interferência.



Figura 10 – Equipamento MT00 da Maselli Misure (Maselli, 2014).

Ao efetuar uma medição de refletância e turbidez combinadas, o software do MT pode calcular a densidade ótica nos comprimentos de onda de 280-420-520-880 nm, como abaixo elucidado na figura 11.

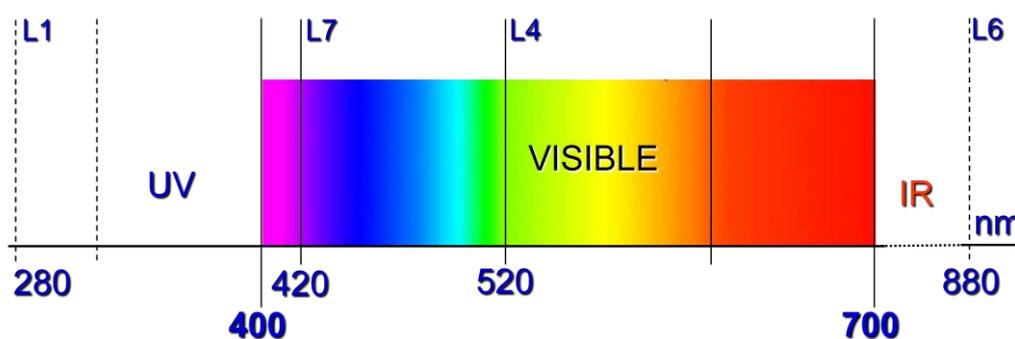


Figura 11 – Gamas de comprimentos de onda analisadas pelo MT00 (Raccagni, 2011).

Os valores do espectro de refletância difusa são extrapolados para todos os comprimentos de onda e interpretados para calcular os seguintes índices de maturação fenólica:

1. Antocianinas potenciais ou totais (AT): representam a quantidade total de antocianinas extraíveis (medido em laboratório a pH = 1.0), sendo que sua quantidade varia muito, dependendo das castas;
2. Índice de polifenóis totais (IPT): representa o conjunto de compostos polifenóis presentes, medidos a um comprimento de onda de 280 nm;
3. Nuance ou tonalidade (N): é a relação entre o componente clássico amarelo (Abs 420) e o componente vermelho (Abs 520). É um índice de maturidade das uvas tintas. Se estamos na presença de uma amostra de uvas saudáveis e não muito maduro, o índice de maturidade vai mostrar um valor muito alto (cerca de 1). Por outro lado, se estamos na presença de uma amostra de uvas maduras e saudáveis, o índice de maturidade pode ser inferior a 0,4;
4. Extratibilidade de antocianinas (EA): indica a potencialidade de extração das antocianinas durante o processo de vinificação, a qual depende da maturação das uvas, quanto mais maduras estão as uvas, mais a sua película enfraquece; e da casta, pois existem castas que possuem a película dos bagos bastante frágil.
5. Contribuição de taninos provenientes das grainhas (MP%): contribuição dos taninos das grainhas em conteúdo fenólico do bago; o valor de MP depende da casta, as condições de maturação e do número de grainhas por bago;
6. Qualidade Fenólica (QP): O índice QP foi concebido para ser sensível à componente de cor dos polifenóis e estabilidade da cor do vinho resultante. Esta é a medida de compostos fenólicos da uva orientados para a intensidade corante do vinho final.

Aquando da criação do MT00, a empresa Maselli Misure criou vários modelos deste equipamento, para que o mesmo se adapta-se às necessidades específicas de cada adega. A tabela 1 apresenta os parâmetros analisados por cada um dos modelos do equipamento MT00, bem como, as unidades de medição para esses parâmetros, os intervalos de medição, valores típicos de gama de medição, e a

significância esperada dos valores em medição quando comparados com análises de bancada.

Tabela 1 – Características dos vários modelos do MT00 (Raccagni, 2011).

	Unit of measure	Instrument limits	Typical range	Mean value	R ²	Mean error	Correlation
A Tot.	mg/kg	0...10000	500...3500	1500	0.85	180	Highly significant
A Extr.	mg/kg	0...10000	200...1500	700	0.7	180	significant
TPI	D0280	0...200	30...90	60	0.5	15	significant
MP%	%	0...100%	40...60%	55%	0.5	10%	significant
PQ	PQ Units	90...300	100...180	130	n.d.	1	n.d.
T	dimensionless	0.00...3.50	0.30...1.10	0.55	n.d.	0.03	n.d.

	A Tot.	A Extr.	TPI	MP%	PQ	T
MT01	●	●				
MT02	●	●	●	●		
MT03					●	●
MT04	●	●	●	●	●	●

Na figura 12 por ver-se um exemplo de visualização de uma curva de maturação produzida pelo MT00, neste caso, os parâmetros visualizados são o índice de polifenóis total (IPT) e as antocianinas totais (AT).

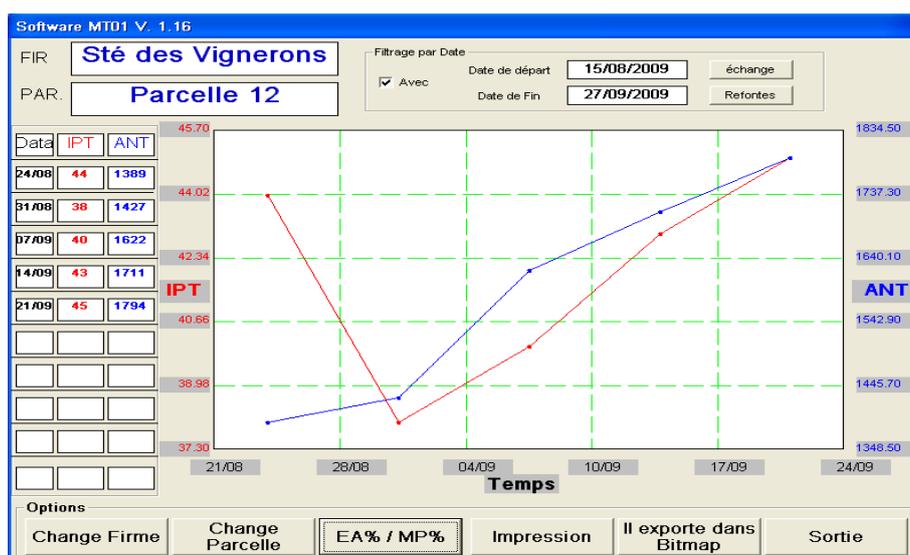


Figura 12 – Exemplo de visualização de uma curva de maturação de uma parcela, com os parâmetros: índice de polifenóis total (IPT) e as antocianinas totais (AT) (<http://www.maselli.com>, 2014).

O equipamento MT00 permite a determinação rápida e precisa do perfil fenólico das uvas, assim, fornece ao enólogo, informação que pode ser utilizada em diferentes fases do processo enológico, como, no acompanhamento da evolução da maturação fenólica, pela determinação do tempo ótimo de colheita e criação de curvas de maturação; na otimização das operações culturais, pela identificação das parcelas com elevado potencial de polifenóis (zonagem) e no acompanhamento da eficácia de determinadas intervenções na vinha; na seleção de uvas durante a colheita, utilizando tecnologias de vinificação diferenciadas, dependendo da qualidade fenólica; e na criação de um banco de dados para criação de históricos por parcelas e por campanha.

Em suma, o MT00 permite ao enólogo uma serie de vantagens, pela forma expedita e rigorosa com que fornece valores de compostos fenólicos da uvas. A empresa Maselli Misure aponta as seguintes mais valias deste equipamento: a análise é realizada diretamente nas uvas trituradas; existe bastante facilidade de uso, mesmo por pessoal não treinado; o método de análise é simples e rápido; não será necessário qualquer outra análise a compostos fenólicos, pois o equipamento abrange todos os parâmetros mais importantes, em maioria equivalentes aos determinados pelo método de Glories (1990); é um método não reativo; o interface de usuário é bastante intuitivo e abrangente, permitindo a apresentação gráfica de dados e criação de uma base de dados abrangente com todas as informações da campanha; custo mínimo por análise.

CAPITULO 3 | METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1. INTRODUÇÃO

3.2. COLHEITA DE AMOSTRAS E METODOLOGIAS

3.2.1. ANÁLISE AOS COMPOSTOS FENÓLICOS

3.2.1.1. ANÁLISE DE BANCADA

3.2.1.2. ANÁLISE POR FTIR

3.2.1.3. ANÁLISE POR REFLETÂNCIA DIFUSA

3.2.2. ANÁLISES GERAIS

3.2.2.1. AÇUCARES

3.2.2.2. PH

3.2.2.3. ACIDEZ TOTAL

3.3. RESULTADOS

3.1. Introdução

As grandes adegas elaboram os seus vinhos a partir de um vasto número de parcelas de vinhas, por vezes em condições de produção bastante distintas e em diferentes regiões, o que origina uma gama extensiva de qualidade de uvas.

Em particular, nas adegas cooperativas, este facto é agravado devido ao elevado número de associados, às diferentes formas de condução das suas parcelas de vinha e à heterogeneidade das condições edafoclimáticas, que contribuem para um elevado grau de variabilidade qualitativa da uva na chegada à adega.

Assim, torna-se indispensável uma criteriosa seleção qualitativa da uva à chegada à adega, de forma a encaminhar os reboques de uva para descarregar em lugares distintos de acordo a aptidão da uva e perfil de vinho pretendido.

Se é verdade que alguns parâmetros qualitativos da uva são de medição rápida e direta, como sendo o teor em açúcar, a acidez, o pH, etc., o mesmo não se verifica para a avaliação dos compostos fenólicos, sendo que estes permitem ao enólogo explorar o máximo potencial da uva, pois a sua concentração e extratibilidade durante a vinificação, conferem ao vinho atributos sensoriais como a estrutura, corpo e adstringência.

Este estudo realizado na CARMIM - Cooperativa Agrícola de Reguengos de Monsaraz, situada em Reguengos de Monsaraz - Alentejo, pretende, como referido, a comparação de metodologias para caracterização fenólica de uma amostra de uva, nomeadamente, entre as metodologias mais clássicas e a metodologia de refletância difusa, sobre a qual se carece de informação, mas que apresenta um elevado potencial, dada a forma expedita e rápida com que pode ser realizada e obtidos dados.

3.2. Colheita de amostras e metodologias

Para a realização deste ensaio foram colhidas 100 amostras de uva tinta durante a campanha de vindima do ano 2012, entre os dias 11 de Setembro e 26 de Setembro. As amostras foram colhidas, diretamente, dos reboques de uva entregues pelos associados da CARMIM, e imediatamente antes da descarga nos tegões.

Nas amostras colhidas, privilegiou-se a heterogeneidade de amostragem, no sentido de obter um largo espectro de estados de maturação fenólica das uvas e conseqüente, maior robustez aquando da comparação dos parâmetros analisados pelas três metodologias.

As amostras de uva foram colhidas em baldes de 20 litros e contemplaram vários cachos de uva, os quais foram desengaçados para recipientes e misturados todos os bagos de cada amostra.

Da totalidade de bagos obtidos por amostra, é retirada, aleatoriamente, a quantidade necessária para a realização das análises aos compostos fenólicos das uvas pelas diferentes metodologias, e análises ao álcool provável, ao pH e à acidez total (tabela em anexo).

3.2.1. Análise aos compostos fenólicos

Para a análise dos compostos fenólicos foram utilizadas as três metodologias, afim de correlacionar os valores obtidos.

Segue uma descrição de cada uma das metodologia utilizadas no decorrer do estudo.

3.2.1.1. Análise de bancada

As análises de bancada para determinação de compostos fenólicos seguiram a metodologia segundo Glories (1990).

A metodologia consiste em recolher 200 bagos de uvas da amostra, sendo estes triturados inteiros com a ajuda de uma trituradora.

Após triturados os bagos, são retirados 50 g e adicionado o mesmo volume de HCl N/10 (solução aquosa a pH 1,0).

São retirados mais 50 g do triturado e adicionado o mesmo volume de solução tampão pH 3,2.

Ambas as preparações, pH 1,0 e pH 3,2, são realizadas em duplicado para avaliação da repetibilidade e conferir consistência ao ensaio.

As quatro preparações são agitadas manualmente e ficam em maceração durante quatro horas.

Passado o tempo de maceração, as preparações são filtradas com lã de vidro, dando origem a duas soluções (cada uma com duplicado), uma identificada como pH 1,0 e outra como pH 3,2. A todos os preparados será aplicado o método de doseamento de antocianinas por descoloração por SO₂ de Glories, descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006).

Cada uma das soluções filtradas dará origem a duas soluções idênticas, solução 1 e 2 a pH 1,0 e a solução 1 e 2 a pH 3,2, constituídas por:

1 ml filtrado + 1 ml EtOH 0,1% HCl + 20 ml HCl 2% (pH=0,8)

Estas duas soluções, após homogeneizadas, darão origem a:

Solução 1 (pH 1,0) = 10 ml solução anterior + 4 ml H₂O

Solução 2 (pH 1,0) = 10 ml solução anterior + 4 ml bissulfito sódio

Solução 1 (pH 3,2) = 10 ml solução anterior + 4 ml H₂O

Solução 2 (pH 3,2) = 10 ml solução anterior + 4 ml bissulfito sódio

Após preparadas, todas as soluções são diluídas para metade.

Segue-se a leitura do percurso ótico de 10 mm de cada amostra a 520 nm, por um espectrofotómetro da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25.



Figura 13 – Espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Lambda 25 (foto de Pedro Correia, 2013).

Todos os dados são registados em tabelas.

A concentração das amostras em antocianinas totais e antocianinas extraíveis é dada pelas seguintes equações:

$$C_{\text{(Totais)}} \text{ (mg/l)} = \Delta d_2 \times 875 \rightarrow \text{(Soluções pH 1,0)}$$

$$C_{\text{(Extraíveis)}} \text{ (mg/l)} = \Delta d_2 \times 875 \rightarrow \text{(Soluções pH 3,2)}$$

Sendo d_2 a diferença entre a absorvância a 520 nm das soluções acima descritas como solução 1 e solução 2.

Para obtenção do teor de polifenóis (IPT), é diluída em 1/100, a solução filtrada da maceração de 4 horas a pH 3,2, e é realizada a leitura do percurso ótico de 1 mm da amostra a 280 nm, por um espectrofotómetro, $\lambda = 280$ nm.

Para o cálculo do valor de IPT aplica-se a seguinte equação:

$$I_{280} = \text{Abs}_{280} \times \text{diluição}$$

A partir das análises realizadas às soluções preparadas, calculam-se o índice de maturidade celular, também designado de extratibilidade de antocianinas (EA) e a contribuição de taninos provenientes das grainhas (MP) (%) mediante as equações apresentadas abaixo (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006):

$$\text{AE (\%)} = \frac{\text{A pH 1,0} - \text{A pH 3,2}}{\text{A pH 1,0}} \times 100$$

$$\text{MP (\%)} = \frac{\text{Abs 280} - (\text{A pH 3,2} \times 40)}{\text{Abs 280}} \times 100$$

É conhecido que o valor de Abs 280 para os extratos da película está correlacionado com a concentração de antocianinas por uma relação aproximada de $\text{Abs 280} = \text{A pH 3,2} \times 40$, sendo A pH 3,2 expresso em g/l.

3.2.1.2. Análise por FTIR

As análises foram feitas num espectrómetro Winescan FT120 fabricado pela FOSS (figura 13) que permite a leitura do espectro de infravermelho na gama de 926 a 5012 cm^{-1} ; onde foram analisados os seguintes parâmetros: níveis de açúcar, acidez total, pH, índice de polifenóis, antocianinas, intensidade de cor.



Figura 14 – Equipamento Winescan FT120 (foto de Pedro Correia, 2013)

O Winescan FT120 calcula os resultados através de uma regressão PLS (Partial Least Squares) utilizando 15 filtros por parâmetro. Todos os parâmetros são analisados em duplicado, no mesmo tempo de análise (60 segundos) e utilizando um volume de amostra de 20 ml.

Sendo o Winescan um aparelho destinado à análise de vinhos, os bagos antes de analisados devem ser triturados numa trituradora e o mosto obtido filtrado num filtro de vácuo ou centrifugado, tendo sido utilizado o filtro de vácuo.

3.2.1.3. Análise por refletância difusa

Para realização da análise de compostos fenólicos por refletância difusa, foi utilizado o equipamento da empresa Masseli Misure, o MT02. Este equipamento, por uma medição ótica, traduz a evolução da maturação fenólica diretamente a partir do sumo de uvas esmagadas, mosto.

O MT02 efetua, em poucos segundos, e diretamente sobre a amostra de uvas triturada, as seguintes análises:

- Antocianinas potenciais ou totais (AE / AT)
- Índice de polifenóis totais (IPT)
- Extratibilidade das antocianinas (EA%)
- Contribuição de taninos provenientes das grainhas (MP%)



Figura 15 – Equipamento MT00 (Masselli, 2014).

O método de análise dos compostos fenólicos pelo MT02 prevê a mistura uma quantidade de 200 bagos. O aparelho é fornecido com um misturador e um temporizador que controla o tempo de mistura e de espera antes de iniciar a medição, seguindo os passos que se descrevem:

Passo 1. - trituração 1 minuto;

Passo 2. - medição 5 segundos (medição de referência para o cálculo da capacidade de extração de antocianinas);

Passo 3. - trituração 4 minutos;

Passo 4. - esperar 10 a 15 Minutos;

Passo 5. - medição 5 segundos (medição e processamento dos resultados finais).



Figura 16 – Equipamento MT com o triturador (Maselli, 2014).

Após a obtenção dos resultados de análise da amostra, todos os dados são guardados numa base de dados interna, ou exportados para outro dispositivo, para que possam ser tratados.

3.2.2. Análises gerais

Todas as amostras de uva recolhidas foram analisadas no laboratório da CARMIM, por forma a caracterizar alguns dos seus parâmetros qualitativos, e permitir uma melhor avaliação da variabilidade e heterogeneidade das amostras em estudo.

Por cada amostra foi analisado o teor em açúcar, o pH e a acidez total, utilizando as metodologias abaixo descritas.

3.2.2.1. Açúcares

O método utilizado foi a refratometria, tendo sido utilizado um refratómetro portátil (método OIV, 1990). Os resultados são expressos em % vol. de álcool provável.

3.2.2.2. pH

A concentração hidrogeniônica do meio, neste caso do mosto obtido pelo esmagamento das uvas da amostra, é definida pela seguinte expressão:

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

Para tal, utilizou-se um potenciômetro da marca Splabor, sendo que o método se baseia na determinação do potencial por um eletrodo, calibrado com solução tampão a pH conhecido.

3.2.2.3. Acidez total

A determinação da acidez total é realizada através da titulação ácido-base (NPI-2139), que consiste, basicamente, na neutralização dos ácidos por solução alcalina (NaOH 0,1M) na presença de um indicador, neste caso o azul de bromotimol. Os resultados são expressos em gramas de ácido tartárico por litro (g/L ác. tartárico).

3.3 Resultados

Para a apresentação dos resultados referentes ao estudo de comparação de metodologias para determinação da maturação fenólica das uvas, recorreu-se à utilização de gráficos e tabelas, de forma a garantir uma melhor visualização dos valores obtidos.

3.3.1 Características das uvas em análise

Para as 100 amostras de uva analisadas neste estudo foram realizadas análises laboratoriais ao álcool provável, à acidez total e ao pH, sendo que os valores de máximo, mínimo, média e desvio padrão estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – Valores de máximo, mínimo, média e desvio padrão de álcool provável, acidez total e pH, das 100 amostras de uvas tintas em estudo.

	Alc. Prov. (% vol.)	AT (g/L Ac.Tart)	pH
Máximo	14,80	6,60	4,25
Mínimo	9,80	2,18	3,31
Média	13,13	3,53	3,81
Desvio Padrão	0,93	0,82	0,18

Como anteriormente referido, neste ensaio foi privilegiada a heterogeneidade das amostras de uva, no sentido de obter um largo espectro de estados de maturação fenólica, e conseqüente, maior robustez aquando da comparação dos parâmetros analisados pelas três metodologias.

Da análise da tabela 2 confirma-se essa mesma heterogeneidade entre amostras de uva, mais notória no teor em álcool provável e acidez total das uvas, que apresentam, respetivamente, desvio padrão de 0,93 e 0.82, e máximo e mínimo bastante afastados da média das amostras.

O menor valor de desvio padrão calculado com base nos resultados da determinação do pH das uvas das amostras, reflete a menor variabilidade deste parâmetro.

3.3.2 Determinação de antocianinas totais

A determinação da concentração de antocianinas totais foi realizada, apenas pelo método de bancada Glories (1990) e pelo método de refletância difusa, com o equipamento MT 02. Este parâmetro de maturação fenólica não está predefinido na matriz de análise do equipamento Winescan FT120, assim, não foi possível a sua determinação pela tecnologia FTIR.

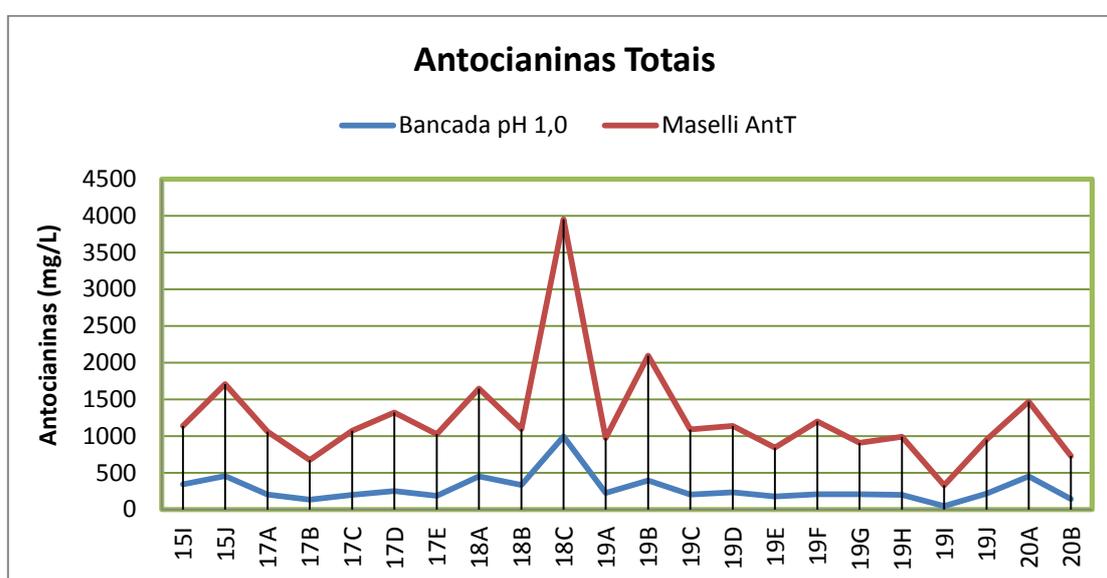


Figura 17 – Excerto do gráfico de valores de antocianinas totais obtidos pela metodologia de bancada método Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.

Na figura 17 estão representados valores quantitativos de antocianinas totais (mg/L) de algumas amostras do ensaio, localizadas entre os dias 15 e 20 de Setembro, e obtidos pela metodologia de bancada e pelo método de refletância difusa (equipamento MT 02).

A análise do gráfico traduz uma diferença na ordem de grandeza entre valores de antocianinas totais determinados pela metodologia de bancada e os valores determinados pela tecnologia de refletância difusa. Contudo, ainda que se verifique esta diferença na ordem de grandeza dos valores absolutos de antocianinas totais, verifica-se a coincidência de valores de pico entre ambas as metodologias, que sugere elevada correlação em termos relativos. Como exemplo, a amostra 18C, que em ambas as metodologias apresenta o valor máximo de antocianinas totais,

e o oposto, a amostra 19I, que apresenta o valor mínimo. Pode ainda notar-se que o distanciamento entre as duas linhas que unem os valores de antocianinas totais de cada metodologia de análise, se mantém mais ou menos constante.

Esta diferença na grandeza dos valores absolutos de antocianinas totais obtidos pelas duas metodologias, pode ter origem no diferente método de preparação de amostras de uva para a realização da análise.

A Figura 18 apresenta a correlação entre os valores de antocianinas obtidos pelas duas metodologias e a equação da linha de tendência.

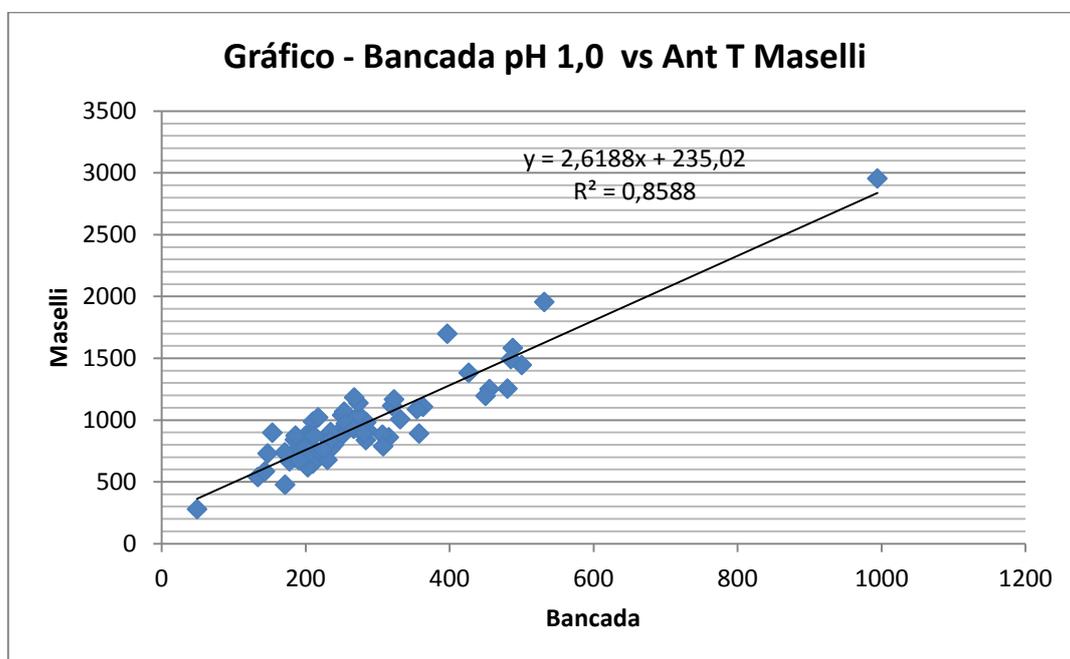


Figura 18 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas totais obtidos pela metodologia de bancada Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.

Da análise do gráfico acima, e traçada a linha de tendência entre os dados obtidos por ambas metodologias, obteve-se um valor de correlação (R^2) de 0,86 que representa a percentagem da variação total observada e explicada pela regressão para o parâmetro em análise.

O valor de x obtido na equação da reta da linha de tendência, indica, relativamente aos valores de y (antocianinas totais (mg/L) obtidos pela metodologia de refletância difusa), que existe uma ordem de grandeza cerca de 2,5 vezes menor

para o valor de antocianinas totais (mg/L) obtidos pela metodologia de bancada para a mesma amostra.

No que respeita ao valor de correlação este está concordante, e até ligeiramente acima, ao valor obtido por Raccagni (2011) de 0,85 para esta mesma comparação de metodologias, na obtenção da concentração de antocianinas totais nas uvas.

Também Anneraud et al. (2009) confirma a validade da metodologia de refletância difusa para a obtenção de parâmetros de maturação fenólica, para a definição da data ótima de vindima.

3.3.3 Determinação de antocianinas extraíveis

A determinação da concentração de antocianinas extraíveis das uvas das amostras estudadas, foi realizada pela metodologia de bancada, metodologia de refletância difusa e metodologia FTIR, para comparação de resultados.

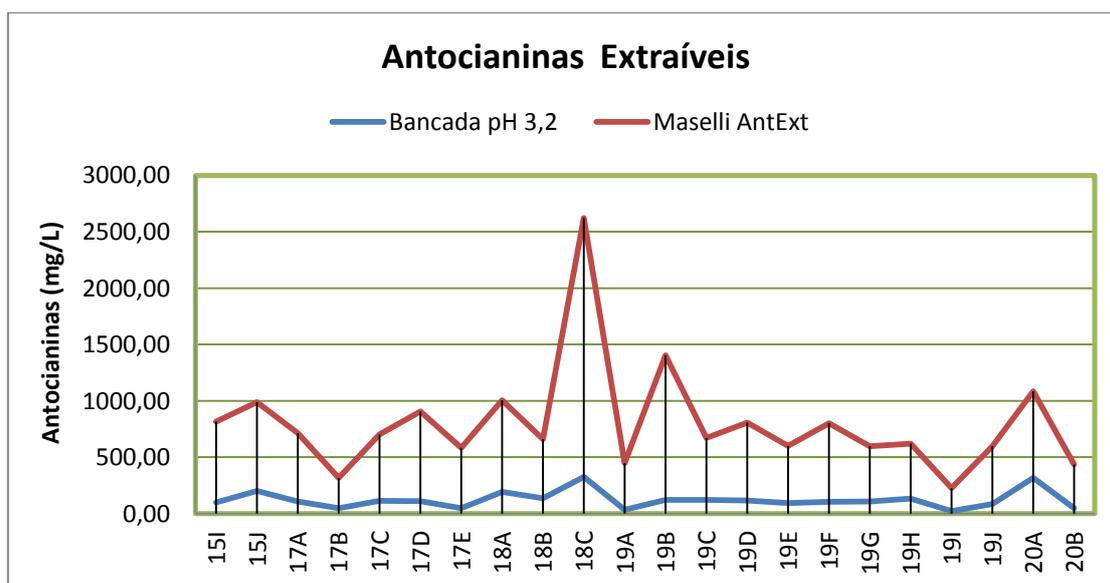


Figura 19 – Excerto do gráfico de valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (Maselli MT02), em mg/L.

À semelhança do apresentado anteriormente, para as antocianinas totais, na figura 19 estão apresentados os valores quantitativos de antocianinas extraíveis (mg/L) de algumas amostras do ensaio, localizadas entre os dias 15 e 20 de Setembro, e obtidos pela metodologia de bancada e pelo método de refletância difusa (equipamento MT 02).

Da análise do gráfico acima, denota-se semelhante diferença na ordem de grandeza entre valores de antocianinas extraíveis determinados pela metodologia de bancada e os valores determinados pela tecnologia de refletância difusa. Esta diferença pode dar-se devido às diferentes formas de preparação das amostras entre as duas metodologias, como anteriormente referido.

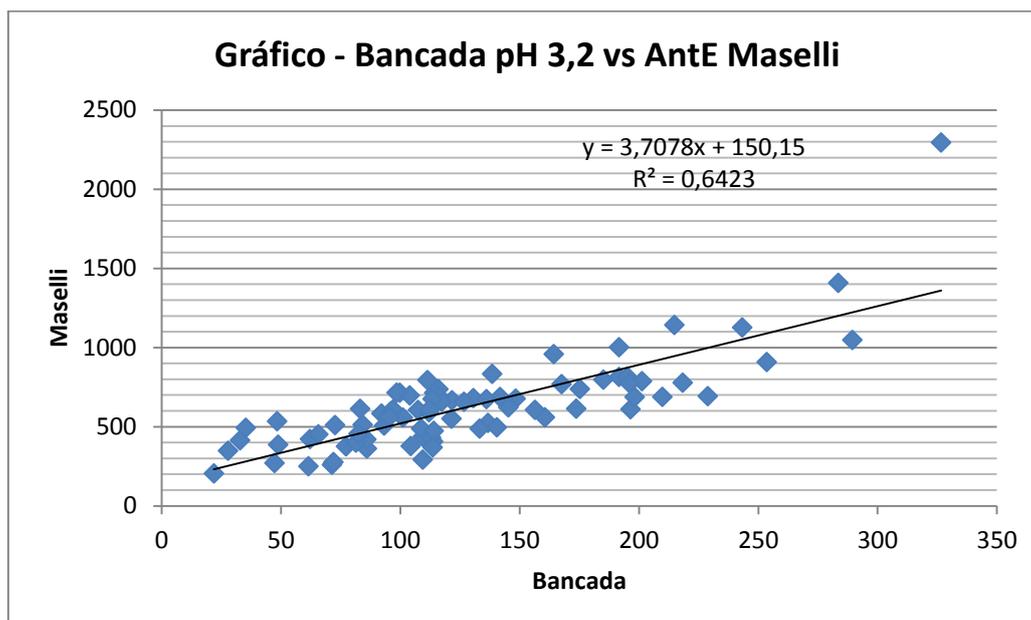


Figura 20 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia de bancada (Glories, 1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.

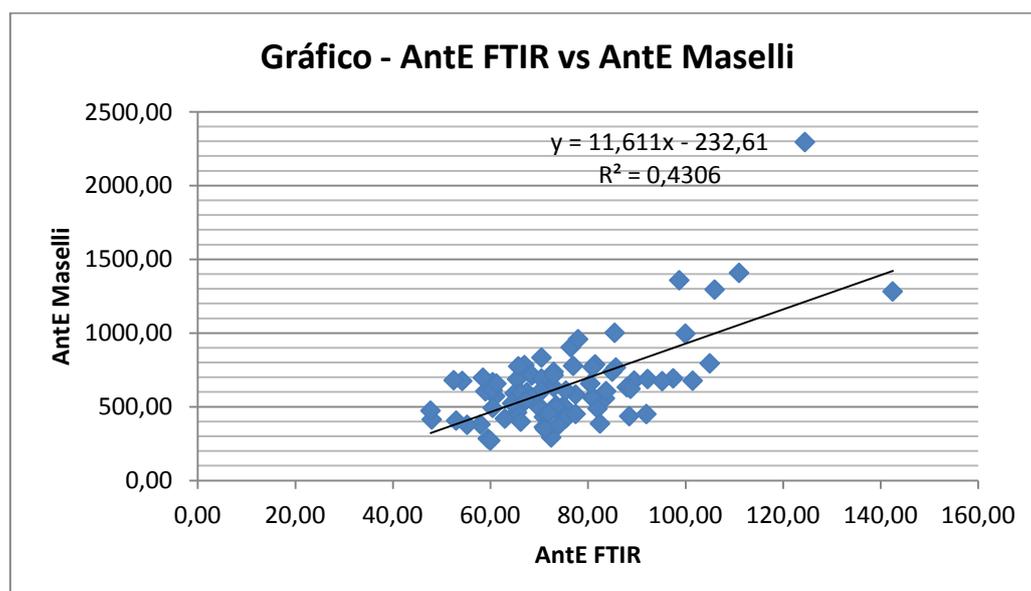


Figura 21 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em mg/L.

Os gráficos das figuras 20 e 21 apresentam as correlações entre a metodologia de bancada e a metodologia FTIR, com a metodologia de refletância difusa, respetivamente.

No gráfico da figura 20, o valor de correlação (R^2) de 0,64 é bastante próximo do valor esperado de 0,70, referenciado por Raccagni (2011) e Maselli (2014).

Quanto à correlação entre a metodologia FTIR e a metodologia de refletância difusa, o valor de R^2 é bastante inferior ao esperado. Esta situação pode dever-se à facto da espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier necessitar basear-se em calibrações analíticas estabelecidas através da quantificação dos parâmetros a analisar, por métodos físico-químicos usuais (Moreira *et al.*, 2002); sendo que a matriz de calibração para o parâmetro antocianinas extraíveis, poderá ainda não possuir a robustez suficiente no equipamento Winescan FT120 utilizado para realização deste ensaio.

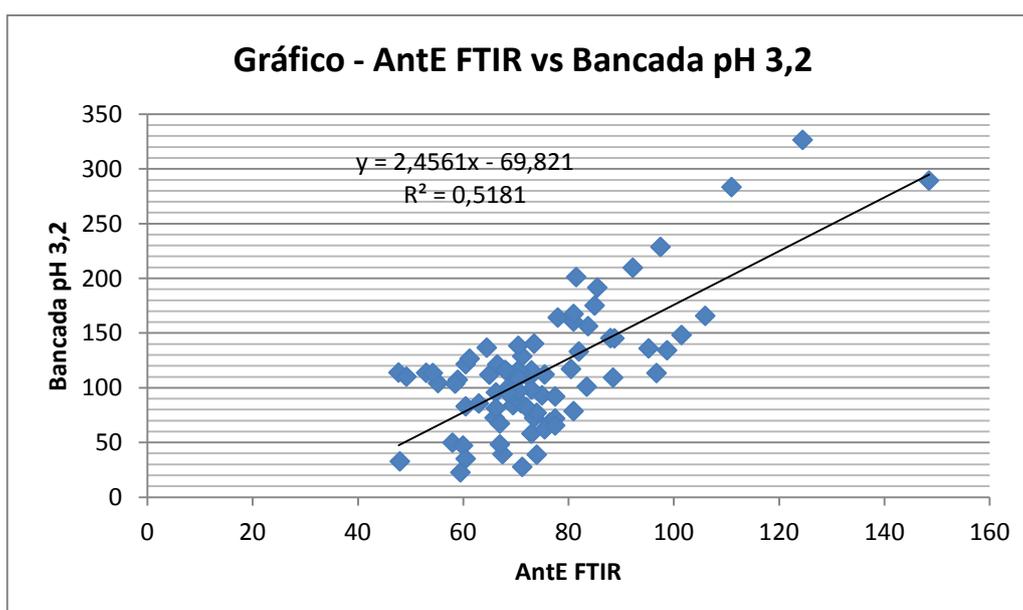


Figura 22 – Gráfico de correlação entre valores de antocianinas extraíveis obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990), em mg/L.

Na figura 22 é apresentado o gráfico que correlaciona a concentração de antocianinas extraíveis obtidas pela metodologia FTIR e pela metodologia de bancada método Glories (1990), que como expetável, apresenta uma correlação semelhante, ainda que um pouco acima, à calculada no gráfico anterior.

3.3.4 Determinação do Índice de Polifenóis Totais - IPT

A determinação do índice de polifenóis foi realizada utilizando as três metodologias em estudo, estando os resultados expressos nos gráficos abaixo.

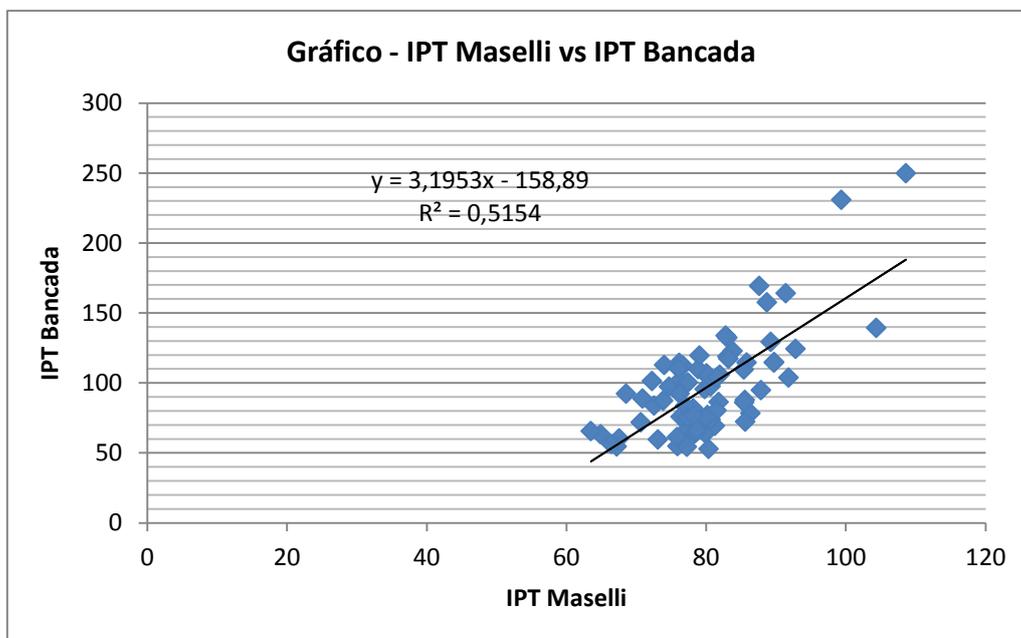


Figura 23 – Gráfico de correlação entre valores de Índice de Polifenóis Totais obtidos pela metodologia de bancada (Glories, 1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02).

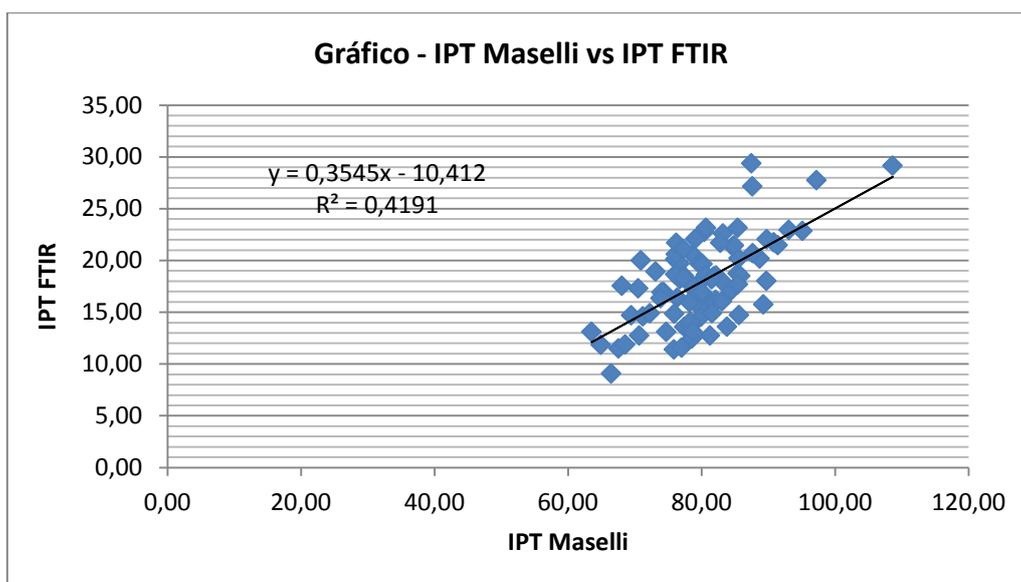


Figura 24 – Gráfico de correlação entre valores de Índice de Polifenóis Totais obtidos pela metodologia FTIR e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02).

Pela análise do gráfico da figura 23, verifica-se um fator de correlação (R^2) de cerca de 0,51, entre os valores de IPT obtidos a partir das amostras de uva analisadas pela metodologia de bancada método Glories (1990) e analisadas pela metodologia de refletância difusa, concordante com o referenciado em bibliografia por Raccagni (2011) e Maselli (2014).

No que refere à correlação entre os valores de IPT obtido pelas metodologias FTIR e de refletância difusa, expressa no gráfico da figura 24, esta encontra-se um pouco abaixo do esperado, possivelmente, pelo facto de insuficiente calibração da matriz do equipamento Winescan FT120, como referenciado no ponto anterior.

3.3.5 Determinação da Extratibilidade das Antocianinas - EA (%)

A determinação da extratibilidade das antocianinas foi realizada, apenas pelo método de bancada Glories (1990) e pelo método de refletância difusa, com o equipamento MT 02. Este parâmetro não está predefinido na matriz de análise do equipamento Winescan FT120, assim, não foi possível a sua determinação pela tecnologia FTIR.

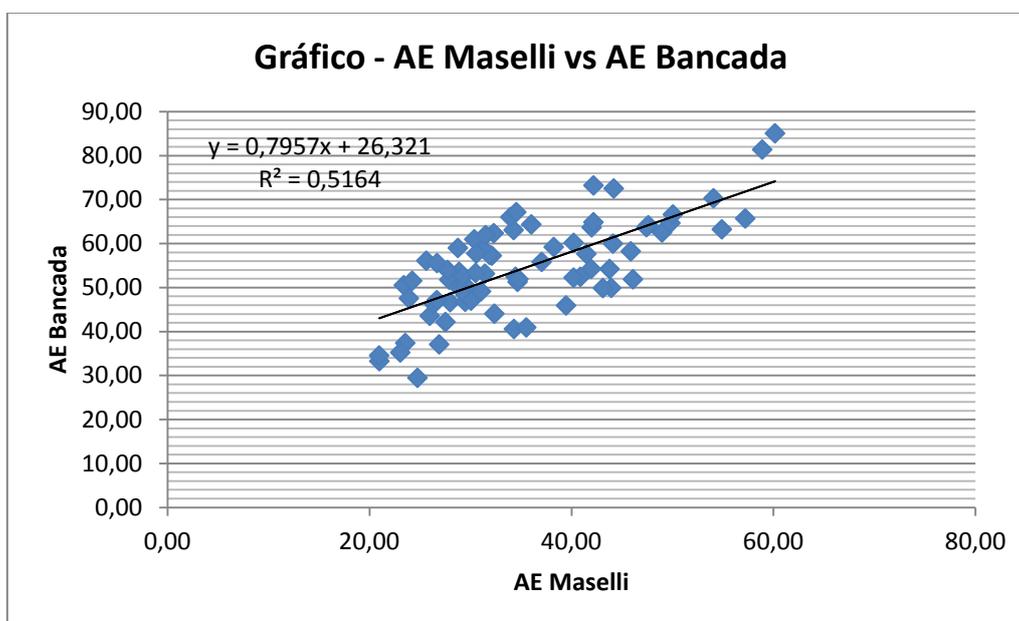


Figura 25 – Gráfico de correlação entre valores de Extratibilidade das Antocianinas obtidos pela metodologia de bancada pelo método de Glories (1990) e pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), em percentagem.

Os valores de extratibilidade das antocianinas das amostras em estudo, quando comparados entre metodologias, originam um fator de correlação de 0,52.

Os valores de AE obtidos pelas duas metodologias apresentam-se dentro do intervalo esperado, que segundo Ribéreau-Gayon (2006) situa-se entre 70 e 20, para uvas à colheita.

3.3.6 Determinação da contribuição dos taninos das grainhas - MP (%)

A contribuição dos taninos das sementes, segundo o método Glories (1990) é calculada, como anteriormente descrito, com base nas absorvâncias a 280 e a 520 nm das soluções preparadas para obtenção do índice de polifenóis totais e antocianinas extraíveis, respetivamente.

Dado a diferença na ordem de grandeza entre valores de antocianinas extraíveis determinados pela metodologia de bancada e os valores determinados pela tecnologia de refletância difusa, anteriormente referida, e usando esse valor em termos absolutos para o cálculo de MP (%), verificou-se uma incoerência dos valores calculados.

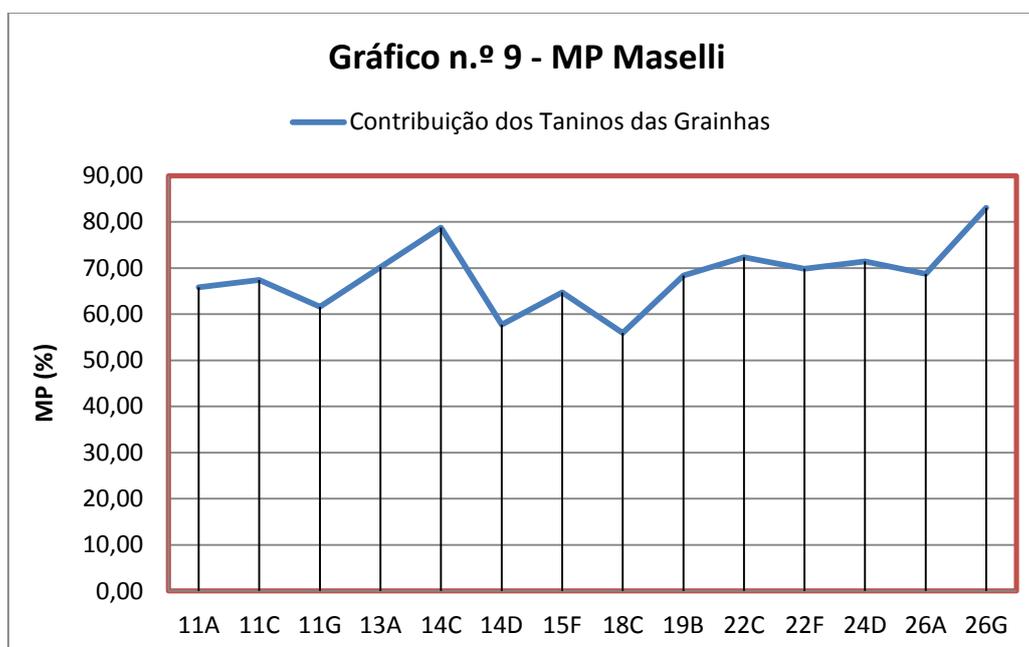


Figura 26 – Gráfico de valores de MP (%) - contribuição dos taninos das grainhas, de várias amostras de uva.

Assim, optou-se por não se apresentarem os dados resultantes do cálculo de MP (%) pela metodologia de bancada Glories (1990), mas apenas alguns dos valores obtidos pela metodologia de refletância difusa, os quais se situam dentro do intervalo esperado para uvas à colheita, ainda que um pouco elevados.

3.3.7 Maturação fenólica pela metodologia de refletância difusa

Após a aplicação das três metodologias para avaliação da maturação fenólica das amostras de uva do ensaio, realizou-se uma consolidação de dados referente aos valores obtidos pela metodologia de refletância difusa, de forma a sistematizar a informação obtida.

Tabela 3 – Valores de máximo, mínimo, média, desvio padrão e fator de correlação de todos os parâmetros analisados pela metodologia de refletância difusa (equipamento Maselli MT02), do universo de amostras em estudo.

	Máximo	Mínimo	Média	Desvio Padrão	R ² Bancada	R ² FTIR	R ² Bibliografia
AntT Maselli	2955,50	253,00	1004,70	401,78	0,86	n.a.	0,85
AntE Maselli	2295,40	204,90	658,30	305,89	0,64	0,43	0,7
IPT Maselli	108,60	33,55	80,71	9,29	0,52	0,42	0,5
AE (%) Maselli	67,63	9,98	35,63	9,91	0,52	n.a.	n.d.
MP (%) Maselli	93,05	55,95	79,67	6,30	n.d.	n.a.	0,5

Na tabela da tabela 3 estão apresentados os dados estatísticos para cada parâmetro analisado pela metodologia de refletância difusa pelo equipamento MT 02, bem como a correlação destes com os parâmetros correspondentes analisados pelas outras metodologias.

Os valores de antocianinas totais apresentam média um pouco abaixo do referido por Ribéreau-Gayon (2006) que aponta para 1.500 mg/L, contudo, o fator correlação obtido entre esta metodologia e a metodologia de bancada, para este parâmetro, situa-se acima do valor referenciado em bibliografia.

No que refere aos valores de antocianinas extraíveis, estes apresentam-se dentro da gama média de referência, contudo, obteve-se uma correlação ligeiramente inferior ao valor esperado de 0,70 (Maselli, 2014).

Os valores obtidos de índice de polifenóis totais no universo das amostras, situam-se dentro do intervalo indicado por Ribéreau-Gayon (2006), que indica que este parâmetro deve variar entre 06 e 120.

A correlação obtida entre a metodologia de refletância difusa e a metodologia de bancada para o IPT, situa-se ligeiramente acima do referenciado em bibliografia por Raccagni (2011). Por outro lado, o fator de correlação obtido em comparação com a metodologia FTIR fica um pouco aquém do valor ambicionado, possivelmente, devido à falta de robustez da matriz de calibração do equipamento utilizado, que necessitam de uma base de dados muito trabalhada para obtenção de resultados fiáveis (Moreira *et al.*, 2002).

Relativamente à extratibilidade das antocianinas verifica-se que o valor médio é de 35,6% que indica uma potencial boa extratibilidade destes compostos, justificada pelo estado avançado de maturação das amostras de uva, principalmente, as colhidas em final de setembro.

Por fim, para a determinação da contribuição dos taninos das sementes, por limitações de dados comparativos, como justificado no ponto anterior, não existiu a possibilidade de realizar a correlação entre metodologias. Os valores obtidos para este parâmetro pela metodologia de refletância difusa, encontram-se um pouco acima da gama de valores referenciados, que se situam entre 45 e 65% (Raccagni, 2011).

CAPITULO 4 | DISCUSSÃO, CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.2. CONCLUSÕES

4.3. PERSPETIVAS FUTURAS

4.1. Considerações Finais

O trabalho apresentado nesta dissertação pretende dar um contributo na comparação de metodologias de avaliação de parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas tintas, ferramenta determinante na ajuda à decisão de vindima.

Uma das maiores dificuldades na execução deste trabalho foi a análise dos parâmetros de maturação fenólica pela metodologia de bancada, pois são análises muito trabalhosas e morosas. Verificou-se também, que na análise das amostras de uva por esta metodologia, os valores obtidos de antocianinas totais e antocianinas extraíveis apresentavam uma diferença na ordem de grandeza quando comparados com os valores determinados pela tecnologia de refletância difusa. Contudo, ainda que se verifique esta diferença, existe coincidência entre valores de pico de ambas as metodologias, que se traduz em elevada correlação em termos relativos. Este facto, compromete apenas o cálculo de parâmetros onde é necessária a utilização do valor absoluto de antocianinas totais ou extraíveis, como a determinação da contribuição dos taninos das sementes (MP).

A referida diferença na ordem de grandeza dos valores obtidos pelas duas metodologias, pode ter origem no método de preparação de amostras de uva para análise.

Outra situação a salientar, foi a obtenção de correlações inferiores ao esperado, quando comparados os valores obtidos para os parâmetros analisados pela metodologia FTIR e a metodologia de refletância difusa.

Esta situação pode dever-se à facto da espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier necessitar basear-se em calibrações analíticas estabelecidas através da quantificação dos parâmetros a analisar, por métodos físico-químicos usuais, sendo que a matriz de calibração para os parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas, ainda não possui a robustez suficiente no equipamento Winescan FT120 utilizado para realização deste ensaio.

4.2. Conclusões

Neste ensaio foi estudada uma nova metodologia de avaliação de parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas tintas, em comparação com metodologias mais habituais. Neste contexto a maturação fenólica de uvas foi avaliada através de espectrofotometria de refletância difusa e através dos métodos de bancada e dos métodos baseados em espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier (FTIR).

Com a realização deste estudo obtiveram-se resultados que permitem validar com sucesso a aplicabilidade da metodologia de refletância difusa para a análise de compostos fenólicos durante a maturação da uva.

Foi verificada a existência de correlações elevadas e em valor muito próximo do sugerido em bibliografia, quando comparados os valores de antocianinas totais, antocianinas extraíveis, índice de polifenóis totais, e extratibilidade de antocianinas obtidos pela análise do universo das amostras de uva pelas metodologias de refletância difusa e metodologia de bancada.

Apenas na análise do parâmetro que avalia a contribuição dos taninos das sementes (MP), não foi possível estabelecer um grau de correlação entre metodologias, devido à diferença na ordem de grandeza entre valores de antocianinas extraíveis determinados pela metodologia de bancada e os valores determinados pela tecnologia de refletância difusa.

No que refere à correlação dos parâmetros em análise entre a metodologia de refletância difusa e a metodologia de espectrofotometria de infra vermelhos com transformada de Fourier (FTIR), esta apresentou-se inferior ao esperado, pela falta de calibração e robustez da matriz do equipamento para análise FTIR.

Verificou-se que todos os parâmetros analisados pela tecnologia de espectrofotometria de refletância difusa, para caracterização da maturação fenólica das uvas das amostras em análise, se encontravam dentro da gama de valores esperados para uvas à colheita.

Esta nova metodologia de análise de parâmetros relacionados com a maturação fenólica das uvas apresenta um elevado potencial no apoio à tomada de decisão de vindima pelo enólogo, pois permite a caracterização fenólica de uma amostragem de uva de forma expedita, rápida e com rigor.

4.3. Perspetivas futuras

No âmbito deste trabalho não foi possível analisar os compostos de cor presentes nos vinhos resultantes das uvas analisadas, contudo, num trabalho futuro, seria de grande interessante compará-los, de forma a equacionar o potencial fenólico dos vinhos à vindima, pela análise à uva e segundo determinada metodologia de vinificação.

Outra vertente a explorar no âmbito da análise das uvas pela tecnologia de espectrofotometria de refletância difusa, será o estudo da instalação desta tecnologia em tempo real na receção de uvas na adega, de forma a separá-las pela sua maturação fenólica e de acordo com o perfil de vinho a produzir.

CAPITULO 5 | BIBLIOGRAFIA

5. Bibliografia

Anneraud, C., Vinsonneau, E. (2009). Maturité technologique et maturité phenolic des raisins. Institut Français de la Vigne et du Vin. ENTAV-ITF, France.

Bautista-Órtin, A. B. (2005). Técnicas enológicas para la obtención de vinos e Monastrell com alto contenido polifenólico. Tese (Doutorado) - Universidade de Murcia, Espanha. 346pp.

Blanco, M., Coello, A., Iturriaga, H., MasPOCH, S., Pagès, J., (1998). Calibration in non-linear near infrared spectroscopy: comparison of several methods, *Analytical Chimica Acta*. N.º 384, 207-214;

Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. MARKAKIS P, *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press. New York. 1-39.

Cabrita, M.J., Ricardo-da-Silva, J., Laureano, O. (2003). Os compostos fenólicos da uvas e dos vinhos. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. I Seminário Internacional de Vitivinicultura. Lisboa.

Cabrita, M.J. (2004). Caracterização físico-química de uvas e vinhos de castas tradicionais do Alentejo. Tese de doutoramento Universidade de Évora. Évora.

Castro, P.R. (2014). A rota do ácido chiquímico e a sua importância na defesa da planta. <http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/>, consultado em 08 de março de 2014.

Champagnol, F. (1984). *Elements de physiologie de la vigne et de viticulture generale*. Éd. François Champagnol. Saint-Gely-du-Fesc. 350 pp.

Combe, B. (1987). Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Proceedings of the symposium on grapevine canopy and vigor management*. 23-35 pp.

Conde, C.; Silva, P.; Fontes, N.; Dias, A.C.P.; Tavares, R.M.; Sousa, M.J.; Agasse, A.; Delrot, S.; Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. Ed. Global Science Book. V.1., n.1, 1-22 pp.

Corrales, M. T. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food science and Emerging Technologies*. N.º 9 , 85-91.

Corrales, M. G. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*. N.º 90 , 415-421.

Curvelo-Garcia, A.S (1988). Controlo de qualidade dos vinhos: química enológica e métodos analíticos. Instituto da Vinha e do Vinho. Portugal.

Dokoozlian, N.K. (2000). Grape berry growth and development. In: Cristensen, P.L. (ed), Raisin production manual, University of California, Agriculture & Natural resources. Oakland. 30-37 pp.

Downey, M., Dokoozlian, N., & Krstic, M. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*. N.º 57, 257-268.

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

Escribano-Bailon, T.A.-G.-G.-B. (2001). Color and Stability of Pigments Derived of Acetaldehydemediated Condensation Between Malvidin 3-O-Glucosid and (+)-catechin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. N.º 49 , 1213 - 1217.

Ferrão, M.F. (2001). Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lóg.*, Santa Cruz do Sul. V.5, n.1, p.63-85.

Flanzy, C. (2000). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, Ediciones Mundi Prensa, 1.ed. Madrid. 786 pp.

Freitas, V. G. (1998). Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*. N.º 49 , 1435-1441.

Garcia, E.; Chacón, J.L.; Martínez, J.; Izquierdo, P.M. (2003). Changes in volatile compounds during ripening in grapes of Airén, Macabeo and Chardonnay white varieties grown in La Mancha region (Spain). *Food Science and Technology International*. V.9, 33-41.

Gaulejac, N.; Vivas N., Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et controle. *Revue Française d'oenologie*. N.º 174, 22-25.

Glories, Y. (1991). Étude des composés phénoliques des raisins rouges, selon les conditions de la maturation et de leur extractibilité au cours de la vinification. *Compte-rendu du Contrat C.I.V.B. Bordeaux*.

González-Neves, G. et al. (2003). Adaptación de la vinificación en tinto en función del potencial polifenólico de las uvas. Experiencias realizadas en la vendimia 2001. *Agrociencia*. V. 7, n. 1, 59-76.

González-Neves, G; Franco, J; Ferrer, M; Moutounet, M; Carbonneau, A. (2007). Predicción de la composición fenólica y el color de los vinos tintos de acuerdo con el potencial polifenólico de la uva. *Proceedings of the XXXth World congress of vine and wine*.

González-Sanjosé, M., Barren, L.J.R., Junquera, B., Robredo, L.M. (1991). Application of principal component analysis to ripening indices for wine grapes. *Journal of Food Composition and Analysis*. N.º 4 , 245-255.

Guerra, C.C. (1998). Evolução polifenólica: longevidade e qualidade dos vinhos Tintos finos. Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura, Enologia e Gastronomia. Embrapa, Uva e Vinho. 55-65 pp.

Guerra, C.C. (2002). Maturação da uva e condução da vinificação para elaboração de vinhos finos. Viticultura e Enologia. Simpósio Mineiro de Viticultura e Enologia, 1. Caldas: EPAMIG-FECD. 179-192 pp.

Harborne, J.B.; Grayer, R.J. (1988). The anthocyanins. The flavonoids: advances in research since 1980. Chapman & Hall, London. 1-20 pp.

Jackson, R. S. (2008). Wine Science - Principles and Applications. Academic Press.

Kelebek, H. C. (2006). Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis Vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. Journal of Food Engineering. N.º 77, 1012-1017.

Kenndy, J.A.; Saucier, C.; Glories, Y. (2006). Grapes and wine phenolics: History and perspective. American Journal of Enology and Viticulture. V. 57, 239-248.

Lissarrague, J.R., Baeza, P., Sánchez-de-Miguel, P. e Girona, J. (2007). Estrategias de gestión del riego en viñedos de vinificación. Fundamentos, aplicación y consecuencias del riego en la vid. Editora Agrícola Española, Madrid. 47-82 pp.

Lopes, R.M.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J. (2000). Flavonóides, Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento. V. 3, n.14, 18-22.

Macheix, J. J., Fleuriet, A. E Billot, J. (1990). The main phenolics of fruits. In Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press, Inc. Florida.

Magalhães, Nuno. (2008). Tratado de Viticultura. A Videira, a Vinha e o Terroir. Publicações Chaves Ferreira. Lisboa. 605 pp.

Mamede, M.E.O.; Pastore, G. M. (2005). Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. B. CEPPA. Curitiba. 233-252 pp.

Mamede, M.E.O.; Cardello, H. M. A. B.; Pastore, G. M. (2005). Evaluation of na aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. Food Chem. V. 89, n. 1, 63-68.

Março, P. H.; Poppi, R. J. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. Quim. Nova. Vol. 31, No. 5, 1218 - 1223.

Maselli (2014). Disponível em www.maselli.com, acedido em 03 de janeiro de 2014.

Matthews, M.A. e Anderson, M.M. (1988). Fruit Ripening in *Vitis vinifera* L.: Response to seasonal water deficits. Am. J. Enol. Vitic. V. 39, 313-320.

Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. (2006). Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. V. 54, 7692-7702.

Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins. In Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press.

Melo, E.A.; Guerra, N.B. (2002). Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Bol. SBCTA, Campinas. V. 36, n. 1, 1-11.

Moreira, J.L.; Marcos, A.M.; Barros, P. (2002). Analysis of Portuguese Wines by Fourier Transform Infrared Spectrometry. Ciência Téc. Vitiv. N.º 17, 27-33.

O.I.V. (2010). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. N.º 1, 89-92.

Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A. e Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* V. 53, 261-267.

Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H, (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical, UK, 2nd edition.

Palacios, J. C. (1986). Evolucion de la maduración e índices de madurez en vides de la Rioja. I.E.R., 8.

Perez-Magarino, S. G.-S. (2004). Evolution of Flavanols, Antocyanins and Their Derivatives During the Aging of Red Wines Elaborated From Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. V. 52, 1181 - 1189.

Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. (2006). Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*. V. 96, 197- 208.

Pinto, F. M. (2002). Caracterização fenólica das castas, tinta roriz, touriga francesa e touriga nacional, produzidas na região do Douro: estudo ao longo da maturação, maceração fermentativa e conservação. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

Raccagni, E. (2011). Maselli misure: una risposta integrata di prodotti e servizi. In *Cantina, Guigno Duemila*. Numero tre, 11.

Reynier, A. (1986). *Manual de viticultura*. Publicações Europa-América. Lisboa.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubouedieu, D. (2006). Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Edition; John Wiley & Sons, Ltd. England.

Rice-Evans, C.; Nicolas, J.; Miller, J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. V. 20, 933-956.

Robredo, L. J.-S. (1991). Biochemical events during ripening of grape berries. Italian journal of food science. V. 3, 173-180.

Santos, Maria de Fátima da Paixão. (2007). Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para Caracterização de Lamas de ETAR para Uso Agrícola. Dissertação, Instituto Superior Técnico.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. Am. J. Enol. Vitic. V. 38, 69-77.

Stringheta, P.C. (1991). Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Tese Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UNICAMP. Campinas. 138 pp.

Su, C.T.; Singleton, V.L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. Phytochemistry. V. 8, 1553-1558.

Susana Río Segade, L. R. (2008). Phenolic ripness assessment of grape skin by texture analysis. Journal of Food Composition and Analysis. 644 - 649 pp.

Tarara, J., Lee, J., Spayd, S., & Scagel, C. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. American Journal of Enology and Viticulture. V. 59, 235-27.

Teissedre, P.L.; Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Peleg, H.; German, J. B. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* V. 122, 157-168.

Tomaz, F.O.N. (2013). Estudo da Evolução dos Compostos da Uva ao Longo da Maturação em Clima Semi-Árido. Dissertação, Universidade do Porto. Lisboa.

Wrolstad, RE (1976). Colors and pigment analysis in fruit products. Corvallis, Oregon Agricultural Experimental Station. 17 pp.

Zamora, Fernando (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. 1.ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 225 pp.

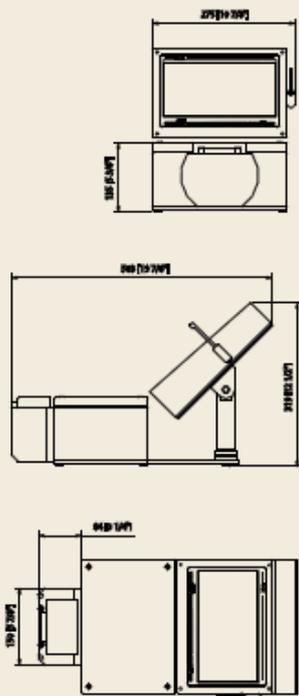
ANEXOS

Anexo A

Especificações do equipamento
Maselli MT00

MT 00

Dimensions



GENERAL SPECIFICATIONS

Application:

Measurement of polyphenols in liquidized red grapes.

Measurement principle:

The MT00 analysis unit operates in the UV - VIS - NIR range measuring diffused reflectance.

OPERATING SPECIFICATIONS

Preparation of the analysis sample:

- Minimum quantity of fresh product: 200 grape berries
- Liquidizing time: 5 minutes.
- Minimum waiting time (after liquidizing): 10 minutes.

Specifications of the product being analysed:

- Minimum turbidity value: 200 FTU.
- Minimum sample volume: 100 ml.

TECHNICAL FEATURES

General

Instrument Specifications:

- Wavelength range: 280...900 nm.
- Measurement time: 10 seconds.

Calibration:

Red Target

Temperature of product in analysis:

10...40 °C.

Dew point on the speculum:

Product at 10 °C with an ambient temperature of 15 °C and relative humidity at 75%.

Parameters measured

Total and Extractable Anthocyanins:

Measurement limits: 0...10000 mg/kg
Accuracy: ±10% of the given reading
Repeatability: ±20 mg/kg

Total Polyphenol Index:

Measurement limits: 0...200
Accuracy: ±20% of the given reading
Repeatability: ±1% of the given reading

Tonality:

Measurement limits: 0...3.50
Accuracy: ±0.03
Repeatability: ±0.005

MP% Index:

Measurement limits: 0...100%
Accuracy: ±10%
Repeatability: ±1%

Phenolic Quality:

Measurement limits: 90...300 PQ units
Accuracy: ±1 PQ units
Repeatability: ±0.50 PQ units

Power supplies

Electrical power supply:

DC +5V 4A, +12V 2A via power adaptor:
AC 100...240V ±10% 47...63Hz 50VA.
Connection via cable with SP7748 plug (IEC-7) 10A/250V for EC versions or with P620 plug 15A/125V for USA versions.

Interfaces

Serial:

RS232 for connection to a Personal Computer; via 9-pole Male D-connector.

Parallel:

CENTRONICS for Printer connection; via 25-pole Female D-connector.

USB:

A type for external connection.

Ethernet:

RJ45 for external connection.

PS/2:

MiniDIN 6-pole Female for external connection to external keyboard and mouse.

CONSTRUCTION FEATURES

- One-piece casing in 304 AISI stainless steel
- Measuring bowl made from "PVC".
- Analysis test tube made from "PVC" and "Fused Silica"/"Optical Glass".
- Light sources with electronically compensated LEDs.
- Light detector: photodiode with large sensitive surface.
- External temperature sensor "Pt100", for automatic thermostat adjustment.
- Internal temperature sensor "Pt1000", for constant luminosity compensation of LEDs.

Materials in contact with the product:

"PVC" and "Fused Silica" / "Optical Glass".

Product Preparation System:

High-efficiency liquidizer controlled by specific programmer (see accessories).

Dimensions and overall weight of the analysis unit

503 (w) x 319 (h) x 275 (d), 11.7 kg

Dimensions and overall weight of the liquidizer

Ø 250 x 400 (h), 3.5 kg

Dimensions and overall weight of the Programmer

160 (w) x 145 (h) x 110 (d), 2 kg

ACCESSORIES

1) Liquidizer: make OSTER model 6805 - 050.

Liquidizer electrical power supply:

AC 230V ±10% 47...63Hz 500VA.

Note: the instrument is guaranteed only when used with this specific model of liquidizer.

2) Programmer:

This unit tells the operator the sequence and the duration of the operations to be executed.



MASELLI MISURE s.p.a.

43125 Parma - Italy
Via Baganza 4/3
Tel. +39.0521.257411
Fax +39.0521.250484
info@masellimisure.com
www.masellimisure.com



	Unit of measure	Instrument limits	Typical range	Mean value	R ²	Mean error	Correlation
A Tot.	mg/kg	0...10000	500...3500	1500	0.85	180	Highly significant
A Extr.	mg/kg	0...10000	200...1500	700	0.7	180	significant
TPI	DO280	0...200	30...90	60	0.5	15	significant
MP%	%	0...100%	40...60%	55%	0.5	10%	significant
PQ	PQ Units	90...300	100...180	130	n.d.	1	n.d.
T	dimensionless	0.00...3.50	0.30...1.10	0.55	n.d.	0.03	n.d.

	A Tot.	A Extr.	TPI	MP%	PQ	T
MT01	●	●				
MT02	●	●	●	●		
MT03					●	●
MT04	●	●	●	●	●	●

Anexo B

Valores de análise das amostras
de uva do ensaio

Tabela - valores de análise aos compostos fenólicos por refletância difusa (equipamento MT) e parametros de maturação.

Amostra	AntT Maselli	AntE Maselli	IPT	AE (%)	MP (%) MT02	Alc. Prov (% vol.)	AT (g/L AcTart)	pH
11A	1717,50	996,10	82,15	42,00	65,80	14,80	5,20	3,52
11B	1039,00	567,05	82,10	45,42	78,95	13,70	4,50	3,81
11C	1649,00	677,85	84,65	58,89	67,40	14,00	4,00	3,70
11D	620,00	284,80	69,45	54,06	85,35	12,30	4,20	3,71
11E	1023,00	515,35	76,75	49,62	77,95	12,60	3,70	3,80
11F	884,00	451,10	79,95	48,97	81,60	12,30	4,70	3,66
11G	2060,50	1555,35	86,70	24,52	61,60	14,30	3,00	3,92
12A	885,00	599,05	71,20	32,31	79,30	12,50	3,60	3,74
12B	1379,50	903,95	84,45	34,47	73,00	13,60	4,10	3,66
12C	1198,50	783,05	78,70	34,66	74,80	13,80	5,00	3,92
12D	722,50	471,40	68,05	34,75	82,35	12,30	3,30	4,01
12E	656,50	381,10	76,10	41,95	85,65	13,40	5,10	3,67
12F	963,50	633,20	80,40	34,28	80,15	13,40	2,70	4,03
13A	1390,00	1002,15	76,05	27,90	70,15	13,50	3,70	3,68
13B	725,50	406,70	79,90	43,94	84,95	14,00	3,40	3,84
13C	1008,50	610,45	87,35	39,47	80,80	13,00	3,60	3,88
13D	253,00	292,25	33,55	n.d.	n.d.	12,60	2,90	3,91
13E	768,00	436,55	75,90	43,16	83,20	13,30	3,80	3,83
13F	956,50	677,20	85,40	29,20	81,35	13,30	3,20	3,97
13G	803,00	259,95	80,35	67,63	83,55	12,30	3,20	3,87
13H	565,00	613,95	72,55	n.d.	86,95	12,60	5,70	3,90
13I	1135,00	778,20	92,50	31,44	79,55	13,50	4,80	3,62
13J	980,50	737,35	77,30	24,80	78,95	12,70	3,20	3,85
14A	906,50	693,05	70,90	23,55	78,90	14,30	2,60	3,91
14B	1102,50	687,55	87,50	37,64	79,05	14,60	4,50	3,77
14C	1090,50	797,10	85,55	26,91	78,75	13,20	2,90	3,96
14D	2120,00	1142,80	81,95	46,09	57,70	12,40	5,10	3,40
14E	998,00	557,75	84,85	44,11	80,45	12,50	3,10	3,87
14F	845,50	431,40	76,35	48,98	81,60	12,40	3,60	3,63
15A	982,50	666,95	80,25	32,12	80,00	12,30	3,00	3,73
15B	929,00	687,70	79,65	25,97	80,60	12,60	2,70	4,01
15C	1040,00	571,60	83,05	45,04	79,10	13,50	4,10	3,89
15D	725,50	462,00	74,30	36,32	83,75	13,20	2,80	4,01
15E	1583,50	1127,05	99,35	28,83	73,65	13,90	6,60	3,67
15F	1956,00	1408,50	90,80	27,99	64,75	13,50	4,90	3,77
15G	868,50	559,40	83,80	35,59	82,70	13,80	4,10	3,88
15H	1116,00	713,90	80,05	36,03	76,70	13,30	2,90	3,79
15I	794,00	714,75	70,50	9,98	81,35	12,20	4,00	3,48
15J	1251,50	787,75	91,80	37,06	77,25	11,20	4,10	3,66
17A	859,00	605,75	76,70	29,48	81,30	13,00	3,00	3,93
17B	539,50	270,80	72,25	49,81	87,60	13,40	3,90	3,68
17C	875,00	591,75	83,05	32,37	82,50	13,00	2,60	3,99
17D	1068,50	794,60	83,20	25,63	78,70	13,50	4,10	3,91
17E	841,00	534,50	76,15	36,44	81,75	11,30	4,20	3,86
18A	1196,00	814,55	87,85	31,89	77,35	14,00	5,10	3,31
18B	761,50	524,20	74,70	31,16	83,05	12,00	2,80	3,75
18C	2955,50	2295,40	108,60	22,33	55,95	13,40	3,60	3,67
19A	747,50	414,10	67,55	44,60	81,70	13,10	4,00	3,56
19B	1699,00	1282,40	87,60	24,52	68,35	13,20	3,90	3,78
19C	884,50	550,70	75,85	37,74	80,60	13,00	4,20	3,72
19D	903,50	692,00	79,80	23,41	81,15	12,40	2,60	4,01
19E	666,50	507,15	80,15	23,91	86,15	11,80	2,30	4,13
19F	988,50	697,60	78,85	29,43	79,20	14,20	2,60	3,73
19G	699,00	488,20	77,15	30,16	84,95	13,30	2,60	3,95
19H	788,00	488,25	82,80	38,04	84,30	14,50	3,20	3,94
19I	279,50	204,90	64,90	26,69	92,85	14,70	3,20	3,64
19J	736,50	512,75	81,80	30,38	85,05	12,40	2,90	3,72
20A	1019,00	766,70	76,20	24,76	77,75	13,80	2,58	3,96
20B	585,50	386,70	67,20	33,95	85,55	12,20	4,70	3,77
20C	647,00	276,85	73,10	57,21	85,30	14,60	3,90	3,90
20D	1383,00	908,50	96,55	34,31	76,25	13,80	4,01	3,71
20E	1022,00	510,45	77,25	50,05	78,25	13,40	2,93	3,84
20F	1107,50	815,30	88,25	26,38	79,20	14,70	2,18	4,25
21A	433,50	259,15	104,35	40,22	93,05	13,80	3,10	3,88
21B	618,50	361,95	77,40	41,48	86,75	13,50	3,60	3,76
21C	1446,00	1048,00	87,45	27,52	72,90	13,40	3,20	3,95
21D	1255,00	774,95	92,80	38,25	77,60	12,80	3,50	3,81
21E	801,50	473,80	78,35	40,89	83,10	11,10	4,30	3,60

A maturação fenólica em uvas tintas. Comparação de metodologias.

Amostra	AntT Maselli	AntE Maselli	IPT	AE (%)	MP (%) MT02	Alc. Prov (% vol.)	AT (g/L AcTart)	pH
21F	918,50	633,30	81,25	31,05	81,15	12,60	5,50	3,59
21G	947,50	657,70	89,75	30,59	82,60	14,10	3,60	4,08
21H	891,00	583,25	80,20	34,54	81,65	14,10	3,90	4,00
22A	891,50	613,00	79,05	31,24	81,40	13,30	3,30	3,86
22B	1007,00	738,40	89,25	26,67	81,20	13,40	3,70	3,75
22C	1493,50	968,50	88,70	35,15	72,35	14,10	3,70	3,58
22D	756,50	422,20	74,00	44,19	83,10	12,50	4,10	3,66
22E	1039,00	715,10	89,70	31,17	80,80	11,70	2,90	3,75
22F	1790,50	1358,55	97,20	24,12	69,85	13,30	3,20	3,82
22G	767,50	606,45	80,65	20,98	84,15	13,50	2,70	4,14
22H	838,50	378,20	78,30	54,90	82,30	13,90	3,50	3,66
22I	1821,00	1295,10	95,10	28,88	68,65	13,60	3,80	3,73
24A	1168,00	675,30	85,80	42,18	77,70	13,40	3,30	3,81
24B	973,00	769,05	85,40	20,96	81,05	13,30	2,80	4,01
24C	861,00	622,25	80,30	27,73	82,15	12,90	2,90	3,74
24D	1487,00	958,65	86,35	35,53	71,45	12,10	4,80	3,49
24E	882,50	496,20	73,85	43,77	80,15	14,60	4,20	3,70
24F	477,50	250,15	63,50	47,61	87,45	9,80	3,60	3,66
24G	706,50	369,55	68,55	47,69	82,90	12,90	4,10	3,54
24H	1088,00	688,50	91,40	36,72	80,25	14,10	3,00	3,92
25A	1138,50	680,60	78,55	40,22	75,80	13,30	3,60	3,83
25B	833,50	593,80	80,65	28,76	82,80	12,80	2,60	3,99
25C	929,50	657,55	78,15	29,26	80,30	14,20	2,60	4,07
25D	695,00	376,15	66,45	45,88	82,65	13,00	2,80	3,74
25E	1183,50	833,85	93,05	29,54	78,95	14,30	2,40	4,15
25F	876,00	608,70	81,50	30,51	82,15	14,20	3,00	4,10
25G	678,00	451,85	70,65	33,36	84,05	10,70	2,90	3,69
25H	890,00	674,30	76,05	24,24	80,65	11,70	2,70	3,98
25I	675,00	493,00	80,05	26,96	85,95	13,10	2,40	4,07
25J	738,50	420,10	77,00	43,11	84,15	12,40	3,60	3,62
26A	1627,50	1114,80	85,60	31,50	68,70	13,80	4,00	3,50
26B	872,50	610,25	85,45	30,06	83,00	11,90	3,00	3,91
26C	730,50	562,10	77,30	23,05	84,30	12,70	2,70	4,07
26D	874,50	348,40	78,65	60,16	81,60	11,20	3,40	3,46
26E	759,50	399,25	81,55	47,43	84,55	13,30	3,40	3,68
26F	788,50	455,85	78,20	42,19	83,25	13,20	3,40	3,80
26G	898,00	546,65	87,65	39,13	83,05	14,10	3,60	3,74