



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Quantificação do ião cálcio nas uvas e  
vinhos brancos por espectroscopia  
de infravermelho**

**Joana Lopes Morgado Véstia**

Orientação: Professora Doutora Ana Elisa de Mendonça Rato

Coorientação: Engenheira Helena Piteira de Almeida Ferreira

**Mestrado em Viticultura e Enologia**

Dissertação

Évora, 2016





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Quantificação do ião cálcio nas uvas e  
vinhos brancos por espectroscopia  
de infravermelho**

**Joana Lopes Morgado Véstia**

Orientação: Professora Doutora Ana Elisa de Mendonça Rato

Coorientação: Engenheira Helena Piteira de Almeida Ferreira

**Mestrado em Viticultura e Enologia**

Dissertação

Évora, 2016



A parte experimental deste trabalho foi realizada  
nos seguintes laboratórios da Universidade de Évora:

Laboratório de Tecnologia e Pós-colheita,

Laboratório de Nutrição Animal,

Laboratório da Água,

Laboratório de Enologia

e no laboratório da Adega Cooperativa de Borba



### **Dedicatória**

Dedico esta dissertação os meus pais, ao meu irmão e aos meus avós, porque a eles devo tudo o que sou hoje.

O meu agradecimento por todo o apoio e confiança que sempre me depositaram.



“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é  
senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”  
(Madre Teresa de Calcuta)



## *Agradecimentos*

A interação entre as universidades e a indústria é sempre uma boa aposta porque permite que a investigação se associe à experiência e aos reais problemas que existem em ambiente industrial. Por este motivo gostaria de agradecer a todos os que possibilitaram a realização do estágio curricular e posteriormente a recolha de amostras na Adega Cooperativa de Borba que permitiu a realização da minha dissertação de mestrado tendo sempre contato com o ambiente industrial.

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, ao longo desta caminhada deparei-me com contributos de natureza diversa que devem ser salientados pois só foi possível realizar esta dissertação de mestrado graças à amabilidade e disponibilidade de várias pessoas, as quais manifesto os meus sinceros e reconhecidos agradecimentos:

- Ao Coordenador do Mestrado em Viticultura e Enologia, Professor Doutor João Mota Barroso, agradeço a oportunidade em frequentar o Mestrado em Viticultura e Enologia que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica, a oportunidade de poder realizar o estágio curricular na Adega Cooperativa de Borba e a ajuda que foi crucial para o bom porto deste trabalho, que foi a escolha das parcelas a analisar com maior e menor teor de cálcio.
- Em particular, à Professora Doutora Ana Elisa Rato, pela sua disponibilidade ao longo de todo este percurso, por todas as sugestões, conselhos e críticas ao longo de todo o percurso, por toda a orientação científica, pela confiança que me concedeu e amizade.
- À Engenheira Helena Ferreira o meu sincero agradecimento pela coorientação neste projeto não podendo esquecer que o tema desta dissertação foi proposto por si pois derivou de um problema enológico observado com alguma regularidade na adega e pela orientação e ensinamentos durante o estágio curricular.
- Ao Engenheiro Luís Gaspar por durante o estágio curricular ter a oportunidade de fazer saídas ao campo e me transmitir os seus conhecimentos e paixão pela viticultura assim como a ajuda incansável durante a recolha das amostras vegetais para a minha dissertação.
- À Engenheira Maria João Rosado e ao Engenheiro Óscar Gato pelos conhecimentos transmitidos durante o estágio curricular que foi o ponto de partida para colocar em prática os conhecimentos adquiridos durante o mestrado.
- À Professora Doutora Maria Manuela Morais pela grande amabilidade em dispor do Laboratório das águas do qual é responsável, obrigada pela forma como sempre fui recebida e ao seu Grupo de Investigação, em especial à Joana Rosado, pela grande ajuda, disponibilidade e simpatia.

- À Engenheira Maria da Graça Machado por me permitir utilizar alguns equipamentos disponíveis no Laboratório de Nutrição e Metabolismo e à Margarida Romão pela ajuda concedida.
- À Professora Doutora Maria João Cabrita por me permitir utilizar alguns equipamentos disponíveis no Laboratório de Enologia e à Engenheira Antónia Oliveira pela ajuda prestada durante a utilização dos equipamentos.
- À D. Felicidade pela sua sempre disponibilidade em coordenar os seus serviços a realizar no laboratório com a movimentação do mesmo, pela sua alegria contagiante e pela sua amizade.
- Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia e Pós-Colheita da Universidade de Évora, Sara Rodrigues, Juliana Agostinho, Rita Fialho, Igor Dias, Camila Tufik, pelo bom ambiente de trabalho, pelos conhecimentos partilhados, inquietudes, companheirismo, preocupações, alegrias e amizade.
- Ao Professor Doutor Miguel Elias, à Professora Doutora Ana Cristina Agulheiro Santos e à Doutora Marta Laranjo muito obrigada pela compreensão, palavras de ânimo, amizade e por me terem permitido durante os dois projetos que tive o privilégio de integrar com eles de me poder ausentar algumas vezes para ir às aulas de mestrado e posteriormente realizar algumas análises laboratoriais fora do local de trabalho.

Ao Luís Carvalho, por todo o apoio incondicional que me deu, pelas horas passadas ao meu lado até à conclusão deste trabalho e pelas palavras de incentivo que me dirigiu em todo o meu percurso.

Um agradecimento especial aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós não podia deixar de manifestar uma palavra de reconhecimento muito especial para eles, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de a minha vida sempre me encorajaram a abraçar desafios e a dar sempre o melhor. Obrigado por terem acreditado em mim uma vez mais.

A todos o que de uma forma ou de outra se cruzaram comigo durante esta etapa, muito OBRIGADA e como Isaac Newton um dia referiu "Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes".

## *Resumo*

**Titulo:** *Quantificação do íão cálcio nas uvas e vinhos brancos por espectroscopia de infravermelho*

Com o objetivo de diminuir a incidência das leveduras encapsulas em alginato se aglomerarem na segunda fermentação em garrafa e reduzir custos associados à sua eliminação, pretendeu-se utilizar a metodologia NIR para determinar a quantidade de cálcio no vinho. Foram quantificados outros minerais para avaliar hipotéticos antagonismos iónicos.

Observou-se também que este controlo de qualidade poderá ser efetuado no mosto.

Atualmente este controlo é realizado por metodologias de análise de referência bastante morosas como EAA. Contudo a metodologia NIR demonstrou ser uma boa alternativa no controlo dos parâmetros de qualidade na produção de vinho espumante, permitindo a diminuição do tempo de análise e de resíduos.

No desenvolvimento dos modelos matemáticos para a calibração do NIR utilizaram-se 79 vinhos brancos e 60 amostras de mosto. Foram desenvolvidos 11 modelos de calibração onde o coeficiente de correlação foi, em aproximadamente 58% dos casos, maior que 0,99.

**Palavras-chave:** Cálcio; Potássio; Magnésio; Uvas e Vinho; Espectroscopia de Infravermelho



## *Abstract*

**Title:** *Quantification of calcium ion in grape and white wines by infrared spectroscopy*

In order to reduce the incidence of alginate beads aggregation during the second fermentation in the bottle and to reduce costs associated with their disposal, it was used the NIR technology to quantify calcium content in the wine. Other minerals were also quantified in order to evaluate possible ionic antagonisms.

Quality control is usually done in the base wine but it can also be evaluated in the must.

Currently this control was carried out by reference analysis methodologies generally rather slow as AAS. However NIR proved to be a good alternative technique in the control of quality parameters of wine production, allowing the reduction of the analysis time and waste.

In order to develop mathematical models for the calibration of NIR it was used 79 white wine samples and 60 must samples. Eleven calibration models have been developed, where the correlation coefficient was, in approximately 58% of cases, greater than 0,99.

**Keyword:** calcium, potassium, magnesium, grape and wine, infrared spectroscopy



## Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO .....	XXVII
ABSTRACT .....	XIX
ÍNDICE GERAL.....	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXIV
ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....	XXVI
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	XXV
I- INTRODUÇÃO .....	1
<i>OBJETIVOS PRINCIPAIS:</i> .....	6
<i>ESTRUTURA DO TRABALHO:</i> .....	6
II- ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....	9
2.1 - <i>MORFOLOGIA DA VIDEIRA</i> .....	11
2.1.1 - <i>Raiz</i> .....	11
2.1.2 - <i>Caule</i> .....	12
2.1.3 - <i>Folha</i> .....	13
2.1.4 - <i>Bago</i> .....	13
2.2 - <i>VIDEIRA</i> .....	14
2.3 - <i>PRODUÇÃO VITIVINÍCOLA</i> .....	16
2.3.1 - <i>Regiões vitivinícolas de Portugal</i> .....	17
2.3.2 - <i>A região vitivinícola do Alentejo</i> .....	18
2.3.3 - <i>Borba</i> .....	21
2.4 - <i>PORTA ENXERTOS</i> .....	22
2.4.1 - <i>1103 Paulsen</i> .....	23
2.4.2 - <i>99 Richter (99 R)</i> .....	24
2.4.3 - <i>110 Richter (110 R)</i> .....	24
2.5 - <i>SOLO</i> .....	25
2.5.1 - <i>Potássio</i> .....	30

2.5.2 - Cálcio.....	32
2.5.3 - Magnésio.....	33
2.5.4 - Azoto.....	34
2.6 - VINHO PRODUZIDO NO ALENTEJO.....	36
2.6.1 - Vinho Espumante.....	37
2.7 – PROTEÍNA NO VINHO.....	41
2.8 - LEVEDURAS ENCAPSULADAS.....	42
2.9 - MÉTODO ANALÍTICO DE REFERÊNCIA.....	47
2.9. 1 - Espectrometria de absorção atómica (EAA).....	47
2.9.1 - Métodos de análise comunitários de referência.....	49
2.10 - VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	50
2.10.1 - Linearidade.....	50
2.10.2 - Limite de deteção e quantificação.....	50
2.10.3 - Exactidão.....	51
2.10.4 - Precisão.....	51
2.10.5 – Taxa de recuperação.....	52
2.11 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	52
2.14.3 - Espectroscopia de Infravermelho Próximo - NIR.....	55
2.15 - Modelos de Calibração.....	59
<b>III - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1 - MATERIAL VEGETAL.....	65
3.1.1 - ‘Arinto’.....	65
3.1.2 - ‘Alvarinho’.....	66
3.2 - ANÁLISES MINERAIS AO SOLO.....	66
3.3 - ANÁLISES MINERAIS ÀS FOLHAS.....	68
3.4 - UVA.....	69
3.5 - VINHO.....	69
3.5.1 - Caracterização do vinho.....	70
3.6 - DETERMINAÇÃO DE MINERAIS (CÁLCIO, POTÁSSIO E MAGNÉSIO) NAS UVAS E VINHO.....	73
3.5.8 - DETERMINAÇÃO DE AZOTO E PROTEÍNA TOTAL MOSTO E VINHO.....	78
3.7 - OBTENÇÃO DE ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	80
3.8 - TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS.....	81
<b>IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>

<b>4.1 - ANÁLISE AO SOLO E FOLIAR</b> .....	85
<b>4.2 - CARACTERIZAÇÃO DO MOSTO E VINHO BASE</b> .....	90
<b>4.3 - QUANTIFICAÇÃO DO AZOTO/PROTEÍNA POR KJELDAHL</b> .....	93
<b>4.4 - QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO, POTÁSSIO E MAGNÉSIO POR EAA NO MOSTO E VINHO BASE</b> .....	96
<b>4.5 - CALIBRAÇÃO DO APARELHO COM TECNOLOGIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO</b> .....	108
<b>V - CONCLUSÃO</b> .....	<b>129</b>
<b>VI - ESTUDOS FUTUROS</b> .....	<b>137</b>
<b>VII - BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>143</b>
<b>VIII - ANEXOS</b> .....	<b>163</b>
ANEXO 1 .....	165
ANEXO 2 .....	168
ANEXO 3 .....	170
ANEXO 4 .....	173
ANEXO 5 .....	182

## *Índice de figuras*

FIGURA 1 - CONSTITUINTES E FUNÇÕES DA VIDEIRA (RETIRADO DE <a href="http://janeladecheiros.blogspot.pt/2011/12/o-entendimento-da-videira-e-da.html">HTTP://JANELADECHEIROS.BLOGSPOT.PT/2011/12/O-ENTENDIMENTO-DA-VIDEIRA-E-DA.HTML</a> ) .....	11
FIGURA 2- CORTE HISTOLÓGICO DE UMA RAIZ DE UM PORTA-ENXERTO. A- TECIDO SUBERTIFICADO; B- PARÊNQUIMA CORTICAL; C- ESCLERÊNQUIMA; D- FLOEMA SECUNDÁRIO; E- CÂMBIO VASCULAR; F- XILEMA SECUNDÁRIO HETERÓGENO; G- RAIOS MEDULARES FORMADOS POR PARÊNQUIMA LENHOSO E PARÊNQUIMA CELULÓSICO (ADAPTADO DE MAGALHÃES, 2008).....	12
FIGURA 3- CORTE HISTOLÓGICO DO CAULE DA <i>VITIS VINIFERA</i> (A- EPIDERME REVESTIDA POR CUTÍCULA; B- COLÊNQUIMA; C- FIBRAS DE ESCLERÊNQUIMA; D- FLOEMA SECUNDÁRIO; E- CÂMBIO LIBERO-LENHOSO; F- XILEMA SECUNDÁRIO; G- XILEMA PRIMÁRIO (ADAPTADO DE MAGALHÃES, 2008) .....	12
FIGURA 4 - CORTE HISTOLÓGICO DE UMA FOLHA DE <i>VITIS VINIFERA</i> (A- EPIDERME DA PAGINA SUPERIOR; B EPIDERME DA PAGINA INFERIOR ONDE SE ENCONTRAM OS ESTOMAS; C-TRICOMA; D. PARÊNQUIMA EM PALIÇADA; E- PARÊNQUIMA LACUNOSO; F- COLÊNQUIMA NA NERVURA CENTRAL; H- LIMBO FOLIAR; I- TECIDO XILÉMICO NA NERVURA CENTRAL; J- FLOEMA NA NERVURA CENTRAL) (ADAPTADO DE MAGALHÃES, 2008) .....	13
FIGURA 5 - CONSTITUINTES DO CACHO (ADAPTADO DE <i>YOUCELLAR</i> , 2015).....	14
FIGURA 6- CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DA <i>VITIS VINIFERA</i> .....	15
FIGURA 7 - CICLO VEGETATIVO E REPRODUTIVO (ADAPTADO DE EICHORN E LORENZ, 1977 E MAGALHÃES, 2008) ..15	

FIGURA 8 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM PORTUGAL CONTINENTAL (1883 - 2014) RETIRADO DE IVV, 2015 .....	17
FIGURA 9- LOCALIZAÇÃO DE PORTUGAL ADAPTADO DO IVV.....	18
FIGURA 10 -MAPA DE PORTUGAL COM DESTAQUE PARA A REGIÃO DO ALENTEJO .....	19
FIGURA 11 - EVOLUÇÃO DA ÁREA DE VINHA NA REGIÃO VITÍCOLA ALENTEJANA.....	20
FIGURA 12 - ABSORÇÃO DOS ELEMENTOS EM FUNÇÃO DO PH. A GROSSURA DAS BARRAS DETERMINA A DISPONIBILIDADE RELATIVA DE CADA ELEMENTO (MAGALHÃES, 2008) .....	27
FIGURA 13 - TROCA CATIONICA NA SUPERFÍCIE DE UMA PARTÍCULA DO SOLO (RETIRADO DE TAIZ E ZEIGER, 2010) ..	29
FIGURA 14- TRANSPORTE DO K <sup>+</sup> PARA A PLANTA E NO SEU INTERIOR (ADAPTADO DE JONES <i>ET AL.</i> , 2013).....	32
FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE ESPUMANTE EM PORTUGAL E REPRESENTATIVIDADE NA PRODUÇÃO NACIONAL.....	37
FIGURA 16- ESQUEMA DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO ESPUMANTE PELO MÉTODO TRADICIONAL E PELO MÉTODO DAS LEVEDURAS ENCAPSULADAS (ADAPTADO DE TORRESI, FRANGIPANE, E ANELLI 2011) .....	40
FIGURA 17- VINHO DE BASE COM LEVEDURAS ENCAPSULADAS (RETIRADO DE PROENOL, 2015).....	42
FIGURA 18 - DIFERENTES IMOBILIZAÇÕES CELULARES DE MICRORGANISMOS. A- LIGADA A UMA SUPERFÍCIE SOLIDA; B- APRISIONADA EM UMA MATRIZ POROSA; C- FLOCULAÇÃO; D- CONTENÇÃO POR MEMBRANAS (ADAPTADO DE KOURKOUTAS <i>ET AL.</i> 2004).....	43
FIGURA 19 - ESTRUTURA DO ALGINATO, ONDE M: ÁCIDO MANURÓNICO E G: ÁCIDO GULURÓNICO (ADAPTADO DE PAWAR E EDGAR, 2012) .....	44
FIGURA 20 - LIGAÇÃO DO IÃO CÁLCIO AOS GRUPOS CARBOXILOS. (ADPATADO DE VOO ET AL. 2016) .....	44
FIGURA 21 – FORMAÇÃO DO HIDROGEL DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	46
FIGURA 22- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA POR CHAMA (ADAPTADO DE (SKOOG <i>ET AL.</i> , 2006) .....	48
FIGURA 23-ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO (ADAPTADO DE SKOOG <i>ET AL.</i> 2006).....	54
FIGURA 24- SOBREPOSIÇÕES E COMBINAÇÕES DE LIGAÇÕES CARACTERÍSTICAS DA ESPETROSCOPIA DE NIR (ADAPTADO DE BERGLES E YANG 2009) .....	55
FIGURA 25- FILTRO ÓTICO ACÚSTICO SINTONIZÁVEL (ADAPTADO DE MATTHEW <i>ET AL.</i> , 2015) .....	57
FIGURA 26- CASTA ARINTO COM FOLHA CARACTERÍSTICA.....	65
FIGURA 27- CASTA ALVARINHO COM FOLHA CARACTERÍSTICA .....	66
FIGURA 28 – PASSOS REALIZADOS DURANTE A DETERMINAÇÃO DOS MINERAIS POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO .....	77
FIGURA 29 – ESQUEMA SOBRE A DETERMINAÇÃO DO AZOTO E PROTEÍNA NO MOSTO E VINHO BASE .....	80
FIGURA 30 – TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO A ESPECTROS OBTIDO POR ESPECTRÓMETRO DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	81
FIGURA 31 - CORRELAÇÃO ENTRE O CÁLCIO DO SOLO E O POTÁSSIO NA FOLHA .....	85
FIGURA 32 - CORRELAÇÃO DO MAGNÉSIO DISPONÍVEL NO SOLO COM O POTÁSSIO .....	86
FIGURA 33 – RELAÇÃO ENTRE O POTÁSSIO DO SOLO E O MAGNÉSIO NAS FOLHAS .....	86

FIGURA 34 – RELAÇÃO ENTRE O POTÁSSIO DO SOLO E O CÁLCIO NAS FOLHAS .....	87
FIGURA 35 – RELAÇÃO ENTRE O POTÁSSIO DO SOLO E O AZOTO NAS FOLHAS .....	88
FIGURA 36 - RELAÇÃO ENTRE O CÁLCIO DO SOLO COM O MAGNÉSIO DAS FOLHAS .....	89
FIGURA 37 - CORRELAÇÃO POSITIVA ENTRE O TEOR DE PROTEÍNA NO VINHO E A TURBIDEZ .....	96
FIGURA 38 - RETA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA A ANÁLISE DO CÁLCIO POR EAA .....	97
FIGURA 39 - RETA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DO POTÁSSIO .....	99
FIGURA 40 - RETA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO .....	100
FIGURA 41-- COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO DIRETAMENTE NO VINHO BASE E ATRAVÉS DA DIGESTÃO ÁCIDA DO VINHO .....	102
FIGURA 42 - COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO DO POTÁSSIO DIRETAMENTE NO VINHO BASE E ATRAVÉS DA DIGESTÃO ÁCIDA DO VINHO .....	102
FIGURA 43 - COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO DO MAGNÉSIO DIRETAMENTE NO VINHO BASE E ATRAVÉS DA DIGESTÃO ÁCIDA DO VINHO .....	103
FIGURA 44 - COMPARAÇÃO ENTRE O TEOR DE CÁLCIO NAS FOLHAS E NO VINHO BASE .....	106
FIGURA 45 - COMPARAÇÃO ENTRE O TEOR DE POTÁSSIO NAS FOLHAS E NO VINHO BASE .....	107
FIGURA 46 - COMPARAÇÃO ENTRE O TEOR DE MAGNÉSIO FOLHAS E NO VINHO BASE .....	107
FIGURA 47- ESPETROS EM BRUTO OBTIDOS PELO EQUIPAMENTO NIR LUMINAR 5030 .....	109
FIGURA 48- OS ESPECTROS INICIAIS SOFRERAM O PRÉ-TRATAMENTO DA LINHA DE BASE .....	110
FIGURA 49- ESPETROS APÓS PRIMEIRA DERIVADA COM ALGORITMO DE SAVITZKY-GOLAY .....	110
FIGURA 50 - ESPECTROS OBTIDOS APÓS A APLICAÇÃO DA VARIAÇÃO NORMAL PADRÃO (SNV) .....	111
FIGURA 51 - ESPECTROS OBTIDOS APÓS A APLICAÇÃO DA CORREÇÃO MULTIPLICATIVA DE SINAL (MSC-EMSC) .....	112
FIGURA 52 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO PARA O VINHO BASE .....	115
FIGURA 53 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO PARA O MOSTO .....	117
FIGURA 54 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE MAGNÉSIO PARA O VINHO BASE .....	118
FIGURA 55 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE MAGNÉSIO PARA O MOSTO .....	119
FIGURA 56- CALIBRAÇÃO DO TEOR DE POTÁSSIO NO VINHO BASE .....	120
FIGURA 57 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE POTÁSSIO NO MOSTO .....	121
FIGURA 58 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE AZOTO NO VINHO BASE .....	122
FIGURA 59 - CALIBRAÇÃO DO TEOR DE AZOTO NO MOSTO .....	123
FIGURA 60- CALIBRAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NO VINHO BASE .....	124
FIGURA 61 – CALIBRAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NO MOSTO .....	125
FIGURA 62- CALIBRAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA TURBIDEZ NO VINHO BASE .....	126
FIGURE 63-SHOWS THE SPECTRA OF ALL SAMPLES AND THE SPECTRA WITH SAVITZKY–GOLAY (SG) AND BASELINE CORRECTION. ....	178

FIGURE 64- SHOWS THE CORRELATION OF THE VALUES OBTAINED IN THE LABORATORY WITH RESPECT TO THOSE PREDICTED BY NIR FOR CALCIUM. .... 179

## *Índice de tabelas*

TABELA 1 - OS DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS DA VINHA REGIÃO DE BORBA EM 2014 .....	16
TABELA 2- ÁREA DE VINHA PLANTADA EM PORTUGAL CONTINENTAL («IVV- INTITUTO DA VINHA E DO VINHO», 2015) .....	20
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DO PORTA-ENXERTO 1103-P .....	24
TABELA 4 - FORMA COMO OS NUTRIENTES (MACRO E MICRONUTRIENTES) SÃO ABSORVIDOS PELA PLANTA (FORMA ASSIMILÁVEL PELAS PLANTAS).....	27
TABELA 5- PARÂMETROS ESTABELECIDOS PARA A FERTILIDADE DO SOLO USADO PELO LABORATÓRIO AGQ – LABS & TECNOLOGICAL SERVICES .....	28
TABELA 6- PRODUÇÃO DE VINHOS DOC ALENTEJANO E DE REGIONAL ALENTEJANO (EM LITROS) NO ANO DE 2014 (VINHOS DO ALENTEJO, 2015). ....	36
TABELA 7- CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DE VINHO BASE PARA ESPUMANTE (CARVALHEIRA, 2012; RIBÉREAU-GAYON ET AL., 2006A).....	39
TABELA 8- CARACTERÍSTICAS DO VINHO ESPUMANTE (REGULAMENTO (CE) N.ª 491/2009 DO CONSELHO DE 25 DE MAIO, 2009; REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 DE 10 DE JULHO DE 2009; 2009, REGULAMENTO (CE) N.º 607/2009 DA COMISSÃO DE 14 DE JULHO, 2009) .....	41
TABELA 9 – CARACTERÍSTICAS IDEIAS PARA UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS ENCAPSULADAS NO VINHO DE BASE (PROENOL, 2003). ....	45
TABELA 10 - VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE FOLIAR SEGUNDO O LABORATÓRIO AGQ - LABS TECNOLOGICAL SERVICES .....	69
TABELA 11- VALORES DE TURBIDEZ ACEITÁVEIS. (RIBÉREAU-GAYON ET AL., 2006A).....	72
TABELA 12- CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTAIS UTILIZADAS PARA A LEITURA DO CÁLCIO .....	74
TABELA 13 - CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTAIS UTILIZADAS PARA A LEITURA DO POTÁSSIO.....	74
TABELA 14- CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTAIS UTILIZADAS PARA A LEITURA DO MAGNÉSIO.....	74
TABELA 15- PADRÕES DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DOS MINERAIS .....	75
TABELA 16- RAMPA DE TEMPERATURA UTILIZADA PARA DIGERIR O MOSTO.....	78
TABELA 17- RAMPA DE TEMPERATURA UTILIZADA PARA DIGERIR O VINHO BASE .....	79
TABELA 18- CARACTERIZAÇÃO DO VINHO BASE ANALISADO.....	93
TABELA 19- PARÂMETROS AVALIADOS PARA O MÉTODO KJELDAHL .....	94
TABELA 20- PARÂMETROS PARA VALIDAR A DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO POR EAA.....	98

TABELA 21- VALORES DE LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A LEITURA DO CATIÃO CÁLCIO .....	98
TABELA 22 – PARÂMETROS PARA VALIDAR A DETERMINAÇÃO DO POTÁSSIO POR EAA.....	99
TABELA 23 - VALORES DE LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A LEITURA DO CATIÃO POTÁSSIO.....	99
TABELA 24 - PARÂMETROS PARA VALIDAR A DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO POR EAA .....	100
TABELA 25 - VALORES DE LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA AS LEITURAS DO CATIÃO MAGNÉSIO .....	101
TABELA 26 – VALORES DE RSD PARA OS PADRÕES DE CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS .....	101
TABELA 27- CONCENTRAÇÃO MÉDIA DOS MINERAIS COM OS RESPETIVOS DESVIO PADRÃO ENCONTRADOS NO MOSTO E VINHO BASE ANALISADO POR EAA .....	104
TABELA 28 – RESUMO DOS TEORES MINERAIS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA O VINHO DERIVADO DE UVAS BRANCAS .....	106
TABELA 29 - INTERPRETAÇÃO DO VALOR ESTATÍSTICO RPD.....	114
TABELA 30 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO PARA O VINHO BASE .....	116
TABELA 31 - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA O CÁLCIO NO VINHO BASE .....	116
TABELA 32 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO NO MOSTO.....	117
TABELA 33 - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA O CÁLCIO NO MOSTO .....	118
TABELA 34 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE MAGNÉSIO NO VINHO BASE .....	119
TABELA 35 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE MAGNÉSIO NO MOSTO.....	120
TABELA 36 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE POTÁSSIO NO VINHO BASE .....	121
TABELA 37- - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE POTÁSSIO NO MOSTO.....	122
TABELA 38 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE AZOTO NO VINHO BASE .....	123
TABELA 39 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE AZOTO NO MOSTO .....	124
TABELA 40- - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NO VINHO BASE .....	125

TABELA 41 - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA NO MOSTO.....	126
TABELA 42- - PARÂMETROS CONSIDERADOS NA AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DA TURBIDEZ NO VINHO BASE .....	127
TABELA 43 - RESULTADOS OBTIDOS PELA CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MINERAIS ESTUDADOS, DO TEOR DE PROTEÍNA E DA TURBIDEZ.....	128
TABELA 44 - RESULTADOS OBTIDOS PELA CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MINERAIS ESTUDADOS, DO TEOR DE PROTEÍNA E DA TURBIDEZ.....	128
TABELA 45 - ESTUDOS DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL A ALGUMAS PLANTAS.....	139
TABELA 46 - TABELA DETALHADA SOBRE OS DADOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR AS CORRELAÇÕES ENTRE OS MINERAIS PRESENTES NO SOLO E NA FOLHA DA VIDEIRA .....	165
TABELA 47 - CARACTERIZAÇÃO DOS 79 VINHOS UTILIZADOS PARA REALIZAR A CALIBRAÇÃO DO NIR .....	168
TABELA 48 - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA O MAGNÉSIO POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA E INFRAVERMELHO PRÓXIMO .....	170
TABELA 49- COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA O POTÁSSIO POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA E INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	170
TABELA 50- COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA O AZOTO POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA E INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	171
TABELA 51- COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA A PROTEÍNA POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA E INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	171
TABELA 52- COMPARAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PARA A TURBIDEZ POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA E INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	172
TABLE 53- CHARACTERIZATION OF THE ANALYSED WINE .....	175

## *Índice de equações*

EQUAÇÃO 1- LIMITE DE DETECÇÃO .....	50
EQUAÇÃO 2- LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	51
EQUAÇÃO 3- ERRO RELATIVO.....	51
EQUAÇÃO 4- DESVIO PADRÃO RELATIVO.....	52
EQUAÇÃO 5- PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO .....	52
EQUAÇÃO 6- DETERMINAÇÃO DO TEOR EM CINZA .....	73
EQUAÇÃO 7- PERCENTAGEM DE AZOTO ORGÂNICO .....	79
EQUAÇÃO 8 - ERRO DA MÉDIA DO QUADRADO DA CALIBRAÇÃO (RMSEC) E DA VALIDAÇÃO (RMSEP).....	113

EQUAÇÃO 9 - DESVIO RESIDUAL DE PREVISÃO .....	114
EQUAÇÃO 10 – ERRO PADRÃO DA CALIBRAÇÃO E PREVISÃO .....	114
EQUAÇÃO 11 - BIAS .....	114



## *Lista de Acrónimos*

AOAC - Associação Oficial dos Químicos Analíticos, agora Associação da Comunidade Analítica (*Association of Official Analytical Chemists*)

Ca - Cálcio

Ca<sup>2+</sup> - Ião cálcio

cm<sup>-1</sup> - Centímetro

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CTC - Capacidade de troca catiónica

DO - Denominação de Origem

DOC - Denominação de Origem Controlada

DOP - Denominação de Origem Protegida

EAA - Espectrometria de Absorção Atómica

FTIR - Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier

GHz - *Gigahertz*

ha – Hectare

hL- Hectolitro

IG - Indicação Geográfica

IGP - Indicação Geográfica Protegida

IPC - Índice de poder clorosante

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

IV - Infravermelho

K - Potássio

K<sup>+</sup> - Ião Potássio

Kg - Quilograma

Km<sup>2</sup> - Quilómetro quadrado

meq - Miliequivalentes

Mg - Magnésio

Mg<sup>2+</sup> - Ião Magnésio

MHz - Megahertz

MSC - Correção Multiplicativa de Sinal

NH<sup>4+</sup> - Ião amónio

NIR- Infravermelho próximo

NO<sup>3-</sup> - Ião nitrato

°C - Graus Celsius

PCA - Análise de Componentes Principais

PCR- Regressão em Componentes Principais

PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

R<sup>2</sup> - coeficiente de correlação

r<sup>2</sup> - o coeficiente de determinação

RMSEC - Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração

RMSECV- Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada

RMSEP- Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão

RMSEV- Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação

RPD - Residual *Prediction Deviation* – Desvio Residual de Previsão

SEC - Standard Error of *Calibration* – erro padrão de calibração

SEP - Standard Errors of *Prediction* – erro padrão de previsão

THz - *Terahertz*

v/v - volume por volume

α - alfa



---

*I Capítulo*

*Introdução*

---





## *I - Introdução*

Hoje em dia, num mercado cada vez mais competitivo, as empresas sentem necessidade de melhorar os seus produtos e conseqüentemente os seus processos de produção. Aliando a isso um maior controlo de qualidade e segurança criou-se a necessidade de desenvolverem novas metodologias de análises, que proporcionem resultados rápidos, precisos e com baixo custo.

A evolução dos produtos alimentares em parceria com a elevada qualidade dos mesmos fez com que o consumidor em geral, no ato da compra de produtos alimentares tome consciência e procure a qualidade e a segurança desses produtos, valorizando bastante determinados atributos, como a cor e o aspeto. Como nos dias de hoje se tem verificado que os conceitos de segurança e qualidade de produtos alimentares têm assumido na nossa sociedade um grande poder de decisão na hora de comprar, o consumidor espera que a gama de produtos que tem à sua escolha seja seguro, idôneo e de boa qualidade. Conseqüentemente as entidades/empresas responsáveis pela produção e desenvolvimento de géneros alimentícios têm como dever responder às expectativas do consumidor, baseando-se na ISSO 9001 onde se encontram os requisitos e na ISO 9000 (norma essa que define a “qualidade” como o “grau de satisfação de requisitos dados por um conjunto de características intrínsecas”) e dentro da área alimentar a ISO 22000. Como se sabe que a característica de qualidade é mensurável, podendo ser caracterizada numa escala de qualificação qualitativa ou quantitativa, as empresas tendem a implementar um sistema de gestão da qualidade visto que a sua implementação e manutenção melhora o seu desempenho, elevando assim o seu padrão de qualidade. Tudo isto irá refletir-se em uma visão de maior garantia e controlo de qualidade desde o início até ao final da cadeia de fabrico do género alimentício, fazendo com que o consumidor tenha mais confiança nos produtos. Para que tal seja possível é necessário que todos os processos sejam controlados e avaliados para que exista um melhor controlo e otimização do progresso global.

Na Adega Cooperativa de Borba, o controlo de qualidade é feito em diversas fases do ciclo de produção, começa no campo com o apoio aos viticultores que fazem parte da cooperativa, mesmo antes da receção das matérias-primas monitorizam a melhor data de colheita, passando depois pelo controlo da receção da matéria-prima, durante o processo de vinificação, no produto acabado e ainda é avaliada a estabilidade das suas características durante o seu ciclo de vida.

O Departamento de Garantia de Qualidade é constituído por dois laboratórios, um que realiza análises físico-químicas e outro onde ocorrem as análises sensoriais ao vinho em diferentes fases de produção, por último, é também de salientar que fazem análises e testes ao material que irá compor a embalagem. O departamento de Garantia de Qualidade faz diariamente diversos tipos de análises e para além do controlo diário, fazem também, um planeamento mensal, trimestral e semestral sendo assim possível garantir que o produto se enquadra em todos os parâmetros

exigidos. Estas análises por vezes podem ser morosas, podem produzir uma quantidade apreciável de resíduos e serem dispendiosas devido a elevada exigência de reagentes e equipamentos necessários.

Em todas as etapas da vinificação até ao produto final (uvas, mosto e vinho) têm de ser cumpridos rigorosos procedimentos de higiene e estabilização (utilização de sulfuroso, colagens, filtrações, entre outras) de modo a garantir que não exista qualquer tipo de contaminação e degradação do produto final, tais como as precipitações proteicas ou minerais que aumentam a turbidez do vinho. Qualquer precipitação no vinho acarreta custos para a resolução do problema e segundo Correa e Polo (1990) o potássio e o cálcio podem precipitar no vinho já engarrafado diminuindo assim a sua qualidade e tornando o produto comercialmente inaceitável. Para além dos problemas de instabilidade proteica e precipitação de tartaratos que por vezes podem ocorrer, atualmente na Adega Cooperativa de Borba, a produção do vinho Espumante apresenta em determinadas ocasiões alguns problemas com a utilização de leveduras encapsuladas em alginato. Na segunda fermentação em garrafa são utilizadas cápsulas de alginato com as leveduras necessárias para que ocorra a segunda fermentação. Utilizam-se leveduras encapsuladas ao invés de leveduras livres uma vez que estas obrigam à preparação de um pé-de-cuba vigorosa, de modo a garantir que no momento da introdução no vinho haja uma população mínima ativa de 1 milhão de células/mL de vinho, enquanto que as leveduras encapsuladas permitem uma inoculação direta. Um outro motivo pretende-se com o facto de que quando se utiliza leveduras livres é posteriormente necessário remover as leveduras, o que permite reduzir o tempo e custos de produção devido à supressão da etapa de *remuage* assim como permite uma melhor gestão do espaço na cave porque o equipamento de *remuage* deixa de ser necessário.

Contudo a utilização das leveduras encapsuladas no vinho de base deve respeitar alguns requisitos. Estas leveduras não devem ser utilizadas em vinhos que apresentem um teor de cálcio superior 80 mg/L (Proenol, 2003). Esta condição surge devido ao risco de ocorrerem agregações das cápsulas de alginato com o ião cálcio presente no vinho de base. Porém uma percentagem considerável do vinho da Adega Cooperativa de Borba contém uma concentração de cálcio superior, provocando a agregação das esferas de alginato que irão formar uma estrutura maior e menos flexível. Quando terminada a fermentação e maturação é necessário retirar as cápsulas de alginato e é nesta etapa da vinificação que os problemas surgem. A agregação das esferas de alginato vão dificultar a tarefa do *dégorgement*. Devido à elevada pressão dentro da garrafa as agregações formadas, que nesta etapa se encontram congeladas, poderão quebrar-se não sendo assim tudo expelido, ficando resíduos dentro da garrafa, deixando assim essa garrafa de poder ser comercial, a não ser que o vinho seja filtrado. A filtração é um processo que acarreta custos, uma vez que seria necessário uma nova garrafa e rolha. O vinho perderia ainda mais pressão e poderia perder algumas qualidades organoléticas. Assim sendo a melhor forma será prevenir, sabendo de antemão qual o teor de cálcio no vinho de base e no caso de este ser alto dever-se-á recorrer a uma estabilização tartárica do vinho utilizando uma formulação comercial que promove a cristalização precoce do bitartarato de potássio e do tartarato de cálcio. Ou então num

futuro próximo ser possível criar uma logística na altura da vindima que permita encaminhar a uva branca para diferentes cubas consoante o seu teor em cálcio de modo a evitar combinar uvas com altos teores de cálcio numa mesma cuba de fermentação. Para a determinação dos minerais os métodos de referência são a espectrometria de absorção atómica (EAA) e a espectrometria por emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), neste trabalho as amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atómica com atomização em chama por ser o equipamento disponível e não por motivos técnicos.

De forma a se conseguir perceber se num futuro próximo será possível controlar e/ou até mesmo saber de antemão quais as uvas que poderão originar vinhos que apresentem problemas durante o processo enológico devido a utilização de leveduras encapsuladas observou-se a associação entre os teores de nutrientes no solo e no tecido foliar. Ou seja, analisou-se o estado nutricional da videira e a fertilidade do solo tendo em conta os minerais cálcio, potássio, magnésio e azoto devido ao já descrito antagonismo que existe entre eles (apenas entre o potássio e o azoto existe uma correlação positiva). Com a continuação do decorrer do trabalho verificou-se algumas precipitações proteicas no vinho (armazenado em garrafa) em estudo pelo que se optou também por analisar o teor de proteínas total no mosto e vinho, visto que este é também considerado um parâmetro de qualidade do vinho que permite controlar no vinho espumante a sua estabilidade assim como algumas das suas características apreciáveis pelo consumidor, a espuma.

Em suma, no final do trabalho foi possível analisar alguns dos parâmetros de qualidade (teor em cálcio, potássio, azoto, proteína e turbidez) mais importantes para a obtenção de um bom vinho espumante.

A existência de métodos analíticos alternativos que possam ser rápidos e capazes de reproduzir fielmente os resultados obtidos pelos métodos de referência é uma mais-valia para qualquer indústria. Assim sendo, com o auxílio da tecnologia informática aliada as técnicas instrumentais de análises químicas e da quimiometria, foi possível encontrar métodos alternativos aos métodos habitualmente utilizados. Estes permitem análises em tempo real de parâmetros físicos e químicos, sem ser necessário nenhum pré-tratamento moroso das amostras e com um menor impacto ambiental pois não existe a criação de resíduos.

### *Objetivos Principais:*

- ✓ Comparar os resultados obtidos por espectroscopia de absorção atômica diretamente no vinho base e após digestão ácida do vinho base;
- ✓ Verificar a possibilidade de a espectrometria de infravermelho ser uma boa alternativa aos métodos de referência e se sim validar essa metodologia;
- ✓ Calibrar o aparelho com tecnologia IR para a determinação simultânea do teor dos minerais cálcio, potássio, magnésio e teor de azoto e proteína em mosto e vinho base
- ✓ Correlacionar os teores de minerais no solo, folhas, mosto e por último vinho de forma a antecipar quais as uvas que darão origem a um vinho que poderá ter problemas com os altos teores de cálcio durante o processo de vinificação do espumante.

### *Estrutura do trabalho:*

A estrutura deste trabalho está disposta em seis capítulos principais seguidos dos anexos.

No primeiro capítulo encontra-se a introdução ao estudo, apresentando-se o objeto de pesquisa, os principais objetivos, contribuição esperada do trabalho e estrutura da dissertação.

No segundo capítulo pode-se observar o enquadramento teórico necessário para a realização do presente estudo de investigação.

O terceiro capítulo faz referência ao material e métodos utilizado para a realização da parte prática desta dissertação e onde se pode observar uma breve descrição do tipo de amostras utilizadas assim como dos métodos de referência utilizados.

No quarto capítulo encontra-se descrito os resultados e conseqüente é feita a discussão dos mesmos tendo em conta as evidências empíricas e as proposições teóricas identificadas a partir da revisão da literatura.

O quinto capítulo apresenta as conclusões da dissertação, onde são identificadas as principais contribuições da pesquisa, quer em termos de conhecimento teórico quer em termos práticos.

No sexto capítulo procedeu-se ainda à identificação de algumas limitações do estudo e apresentação de algumas linhas para investigação futura nesta área.

No final deste trabalho é apresentado a lista da bibliografia utilizada para a sua realização e em anexo, é apresentado uma tabela detalhada sobre os dados utilizados para determinar as correlações entre os minerais presentes no solo e na folha da videira (Anexo 1), uma tabela com a caracterização dos 79 vinhos base utilizados para realizar a calibração do NIR (Anexo 2), no Anexo 3 encontram-se as tabelas com a comparação (aleatória de dez amostra) de resultados obtidos por método o referência e por infravermelho próximo. No anexo 4 pode-se observar o artigo “Quantification of calcium in sparkling wines by infrared spectroscopy” apresentado no 9º Simpósio de Viticultura no Alentejo e no anexo 5 encontra-se o resumo do artigo “Determinação de minerais em vinho” que foi apresentado no Forum Alabe 2016 que foi apresentado no Fórum Alabe 2016.





---

*II Capítulo*

*Enquadramento teórico*

---





## II – Enquadramento teórico

### 2.1 - Morfologia da videira

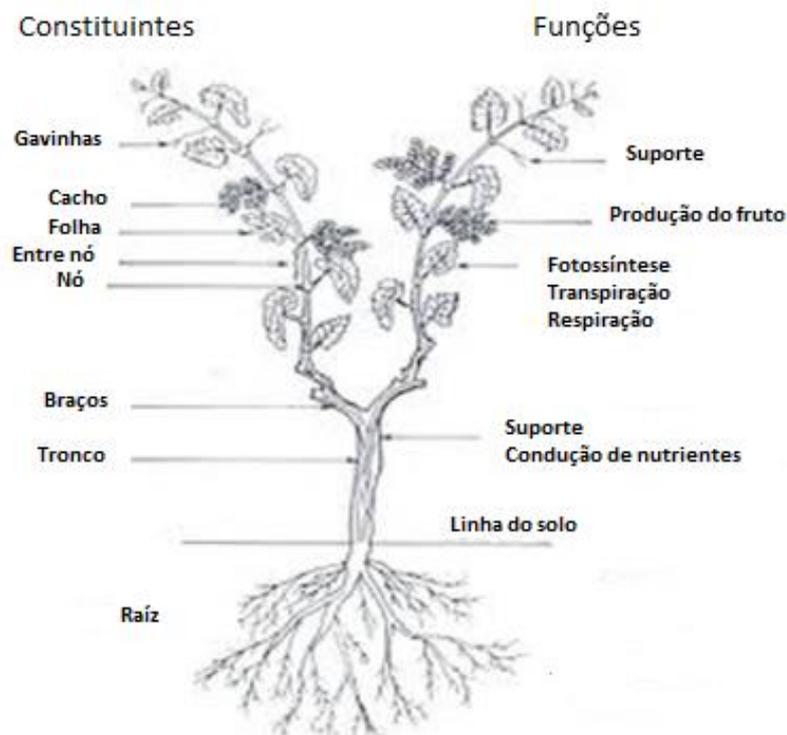


Figura 1 - Constituintes e Funções da videira (retirado de <http://janeladecheiros.blogspot.pt/2011/12/o-entendimento-da-videira-e-da.html>)

#### 2.1.1 - Raiz

As raízes são elementos fundamentais de uma estrutura biológica. O sistema radicular da videira é fasciculado (figura nº2) quando propagada por via vegetativa e é uma estrutura biológica fundamental.

As principais funções das raízes são:

- **Fixação da videira ao solo e estabilização da estrutura aérea** (sobretudo as raízes mais grossas)
- **Absorção de água e de elementos minerais** (sobretudo as raízes mais finas)
- **Acumulação de reservas** (sobretudo amido muito importante durante o abrolhamento e primeiras fases do desenvolvimento vegetativo)
- **Síntese de substâncias de crescimento** (citocininas e giberelinas)

É importante que as raízes possam desenvolver-se em profundidade (chegando as raízes finas a 60 e 120 cm) de modo a que a videira possa ter uma maior capacidade para resistir à seca. A absorção de

nutrientes pode ocorrer por difusão a partir da solução do solo que estabelece um equilíbrio iónico com as células epidérmicas. Este processo é passivo, não exige dispêndio de energia e é não selectivo. Outro processo é por transporte activo de iões através do citoplasma celular. Esse processo depende da respiração ao nível radicular, por isso exige gasto de energia e faz-se contra o gradiente de concentração privilegiando alguns iões (potássio e nitratos mais que o cálcio, fósforo e magnésio). (Marschner, 1995)

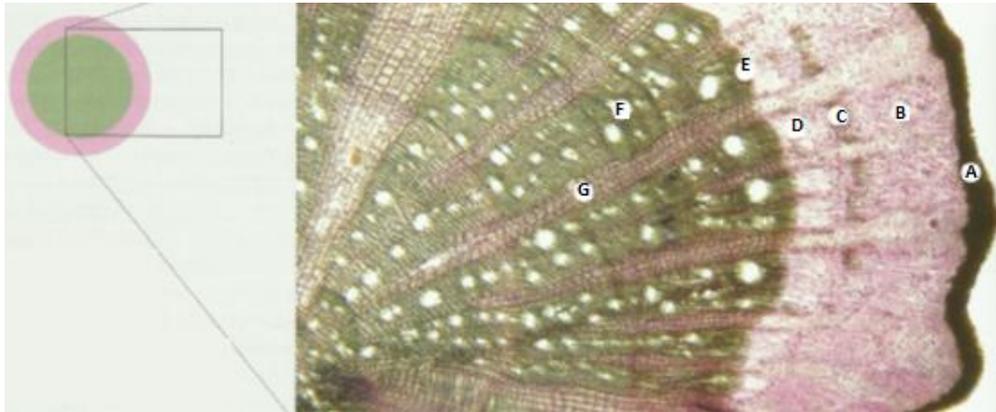


Figura 2- Corte histológico de uma raiz de um porta-enxerto. A- tecido subertificado; B- parênquima cortical; C- esclerênquima; D- floema secundário; E- câmbio vascular; F- xilema secundário heterógeno; G- raios medulares formados por parênquima lenhoso e parênquima celulósico (adaptado de Magalhães, 2008)

### 2.1.2 - Caule

No caule encontra-se o sistema vascular do que pode ser formado por 30 a 60 feixes libero lenhosos, separados pelos raios medulares. Os feixes condutores, o floema na parte exterior e o xilema na parte interior correspondem respetivamente ao líber primário e lenho primário (figura nº3). O líber é formado por tubos crivosos e assentadas de células celulósicas com formação centrípeta. A formação das células do lenho é centrífuga e este é constituído por um parênquima celulósico percorrido por vasos anelados e lenhificados de maior dimensão que conduzem a seiva bruta (Magalhães, 2008).

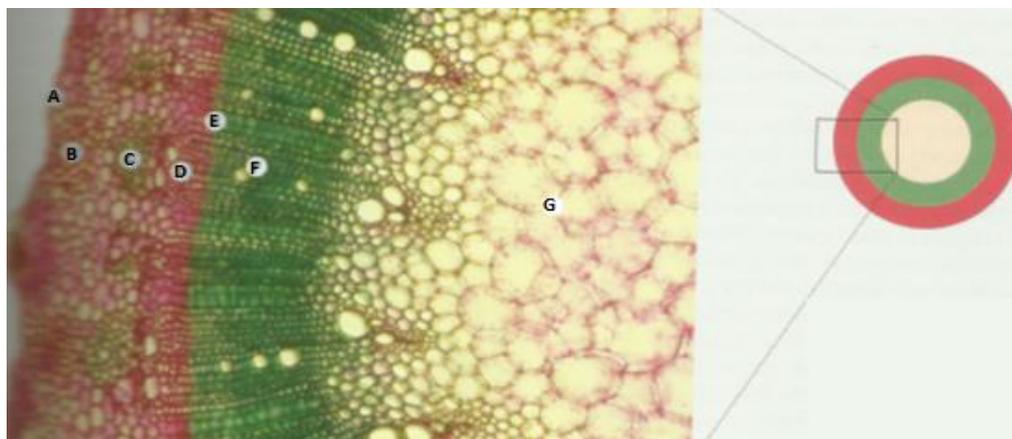


Figura 3- Corte histológico do caule da *Vitis vinifera* (A- epiderme revestida por cutícula; B- colênquima; C- Fibras de esclerênquima; D- floema secundário; E- câmbio libero-lenhoso; F- xilema secundário; G- xilema primário (adaptado de Magalhães, 2008)

### 2.1.3 - Folha

As folhas são órgãos bastante importantes durante a vida da videira uma vez que são responsáveis pela fotossíntese e regulam a temperatura da planta. A folha é composta pelo pecíolo e o limbo. As nervuras principais apresentam ao longo do parênquima lacunoso oito feixes libero-lenhosos (figura nº 4).

É nas folhas que se pode identificar a carência, o desequilíbrio ou toxicidade de um nutriente para a planta; permite averiguar os nutrientes aplicados ao solo estão ou não a ser utilizados pela planta; possibilita verificar e identificar a interação entre nutrientes e por último também facilita saber qual o estado de nutrição da videira num determinado estado fenológico preciso. A análise foliar complementa a análise de solo com o objectivo de estabelecer e gerir adequadamente a fertilização da vinha ao longo dos anos (Cavaco, Calouro e Clímaco, 2005; *Portaria n.º 229-B/2008 de 6 de Março*, 2008).

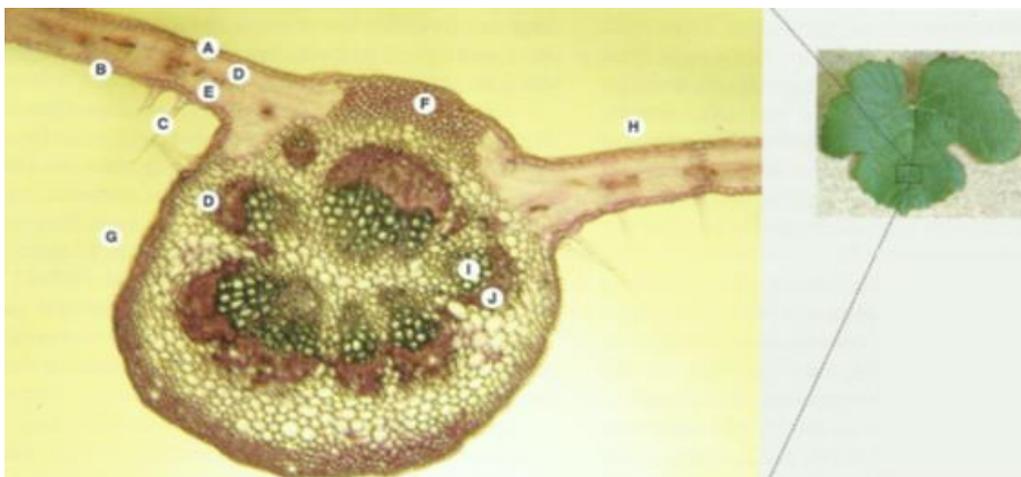


Figura 4- Corte histológico de uma folha de *Vitis vinifera* (A- epiderme da pagina superior; B epiderme da pagina inferior onde se encontram os estomas; C-tricoma; D. parênquima em paliçada; E- parênquima lacunoso; F- colênquima na nervura central; H- limbo foliar; I- Tecido xilémico na nervura central; J- floema na nervura central) (adaptado de Magalhães, 2008)

### 2.1.4 - Bago

O bago de uva encontra-se dividido em pelicula (exocarpo), polpa (mesocarpo) e grainhas (endocarpo - tecido que limita as sementes, distinto da polpa). Quando maduro o cacho em média é composto por 2% - 5% de engaço (pedúnculo, ráquis, pedicelo) e 95% - 98% de bagos, sendo que na constituição do bago, em média, o seu peso médio pode rondar os 1g - 3g correspondendo entre os 74% - 75% à polpa, 20% a 21% à pelicula e 3% a 6% as grainhas (Jackson, 2008).

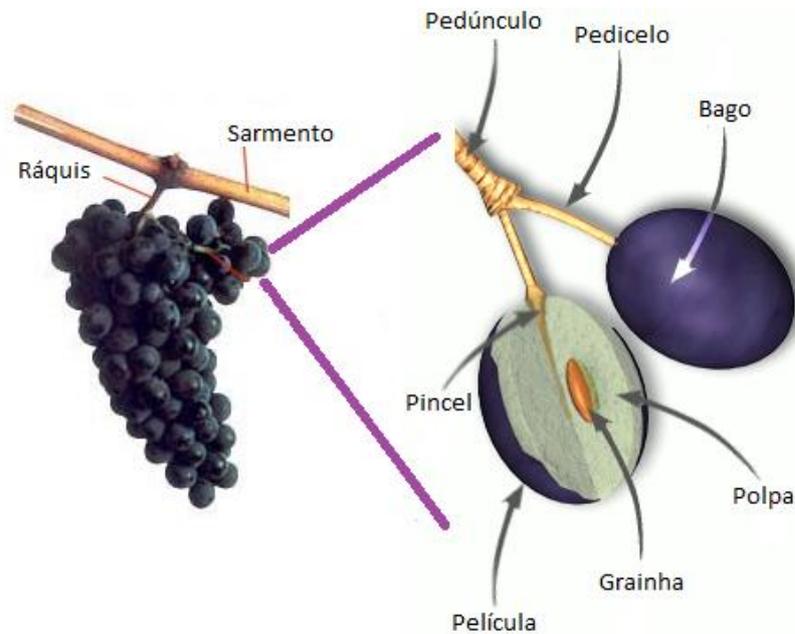


Figura 5 - Constituintes do cacho (adaptado de *YouCellar*, 2015)

Os bagos estão agrupados em cachos e encontram-se ligados ao eixo central, “ráquis”, pelos pedicelos (ambos têm feixes vasculares).

Ao longo de crescimento e amadurecimento do bago o potássio, fósforo, enxofre, magnésio, boro, ferro e cobre são transportados pelo floema. Enquanto que o cálcio, o manganês e o zinco são acumulados principalmente antes do pintor, pelo xilema (Rogiers *et al.*, 2006).

## 2.2 - Videira

O vinho depende da qualidade das uvas que por sua vez depende da vinha, assim sendo, o vinho irá ser influenciado pela casta, tipo de porta-enxerto utilizado (características da planta), pelo solo e clima (factores ambientais), pelo sistema de condução utilizado, utilização ou não utilização de rega, fertilizações, podas, mobilizações, implementação ou não de enrelvamento, vindima, tipo de controlo das infestantes (factores vitícolas) e por último devido aos processos enológicos utilizados.

A videira pertence a família das *Vitáceas* que inclui cerca de mais de setecentas espécies e dezassete géneros, pertencendo esta ao género *Vitis*, ao sub-género *Euvitis* e dentro deste pertence ao grupo Euro-Asiático (figura nº 6). O nome científico da videira é *Vitis vinifera* L.

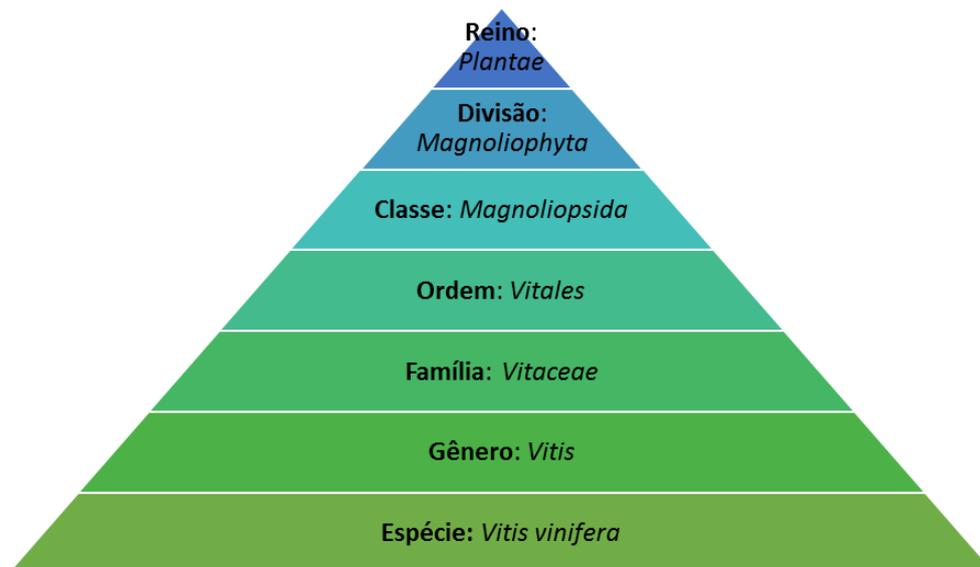


Figura 6- Classificação taxonómica da *Vitis vinifera*

A espécie da família das Vitáceas são plantas fanerogâmicas, angiospérmicas, dicotiledóneas. A videira é uma liana sarmentosa podendo o seu tronco estender-se até aos 20 metros de altura desde que disponham de meios que a suportem e as condições do meio lhe forem favoráveis. (Jackson, 2008) O facto de ser uma liana permite que nos primeiros anos esta seja flexível o que permite que exista diferentes tipos de condução. Um sistema de condução é a forma como a videira é conduzida durante o seu crescimento e esta associada às intervenções no solo e na vegetação, à densidade de plantação, à orientação das lenhas e compasso de plantação (Magalhães, 2008). No Alentejo o sistema de condução mais utilizado é o cordão bilateral (Infovini, 2015).

A videira repete anualmente o ciclo vegetativo e o reprodutivo que a caracteriza como planta perene de folha caduca (figura nº 7).



Figura 7 - Ciclo vegetativo e reprodutivo (adaptado de Eichorn e Lorenz, 1977 e Magalhães, 2008)

A título de exemplo apresenta-se a tabela nº 1 onde se pode verificar as datas médias, referentes ao ano em que se recolheu as amostras para a realização desta dissertação, para cada estado fenológico pelo qual as videiras da região de Borba passaram. Em geral, o período de crescimento vegetativo inicia-se ainda antes do abrolhamento com um fenómeno típico da videira, que nem sempre é percebido, e que recebe o nome popular de “choro” (exsudação da seiva). No Hemisfério Norte o abrolhamento ocorre a partir de Março/Abril e este é controlado pela temperatura (inicia-se quando se eleva a 10 °C) e por estímulos hormonais. A fase de crescimento prolonga-se até ao pintor (Julho-Agosto), fase onde se começa a cessar a divisão e alongamento celular dos ápices vegetativos e do cambio. Durante a fase que decorre do pintor até à maturação fisiológica o crescimento deve cessar e deve-se iniciar a acumulação de açúcares com a diminuição da temperatura e a produção de ácido. No final desta fase verifica-se o início da gradual queda das folhas até à queda total da folha que ocorre em Novembro.

O ciclo reprodutivo ocorre durante dois ciclos vegetativos. Tendo início com a diferenciação dos primórdios das inflorescências no interior dos gomos hibernantes (que irão dar origem aos cachos) e termina no ciclo vegetativo seguinte quando a grainha adquire capacidade germinativa em simultâneo com a maturação fisiológica do bago.

Tabela 1 - Os diferentes estados fenológicos da vinha região de Borba em 2014

<i>Estado</i>	<i>Data</i>	<i>Estado</i>	<i>Data</i>
<b><i>Abrolhamento</i></b>	16 Março	<b><i>Floração</i></b>	21 Maio
<b><i>Gomo de algodão</i></b>	27 Março	<b><i>Alimpa</i></b>	25 Maio
<b><i>Ponta verde</i></b>	28 Março	<b><i>Bago de chumbo</i></b>	27 Maio
<b><i>Saída da folha</i></b>	29 Março	<b><i>Bago de ervilha</i></b>	5 Junho
<b><i>Folhas livres</i></b>	7 Abril	<b><i>Cachos fechados</i></b>	8 Julho
<b><i>Cachos separados</i></b>	13 Abril	<b><i>Início do pintor</i></b>	14 Julho
<b><i>Botões florais</i></b>	29 Abril	<b><i>Início da vindima</i></b>	27 Agosto

### ***2.3 - Produção vitivinícola***

A importância do vinho na economia portuguesa é significativa uma vez que os hectares de vinha que existem, 218.677 ha (até ao dia 31 de Julho de 2014), permitem que este sector empregue um razoável número de pessoas e que com o tempo tenha ganhado valor económico, produzindo na campanha 2014/2015 cerca de 6194774 hL de vinho (ver figura nº 8). Para além disso verificou-se um aumento de exportação do primeiro semestre de 2014 para o primeiro semestre 2015 na ordem dos 4,6%, o que permite que a viticultura seja uma atividade produtiva fundamental para a economia nacional (IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2015). Na campanha de 2014/2015 a adega Cooperativa de Borba recebeu um total 18535095 kg de uva de uma área produtiva de cerca de 2067 ha tendo

obtido uma produtividade média de 8400 kg/ha, que é superior à média de produção no Alentejo (7625 kg/ha, (Caravana, 2015))

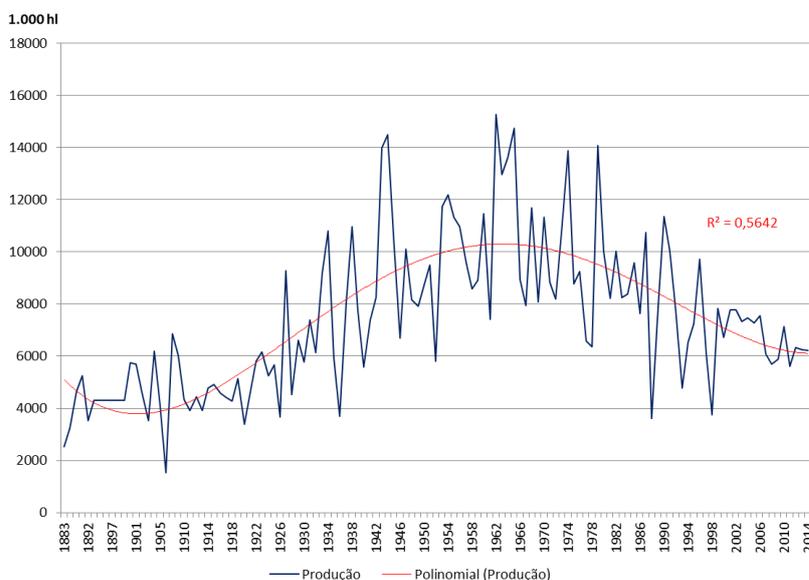


Figura 8 - Evolução da Produção de Vinho em Portugal Continental (1883 - 2014) retirado de IVV, 2015

A chave do sucesso para a produção de vinho de qualidade deveria residir primeiramente na produção de uvas de qualidade. O primeiro passo a ter em conta deverá ser a escolha certa e correta do local da vinha consoante o terreno que se dispõe. Um local com bons solos com boas características para a videira e bem localizado ao nível de disponibilidade de água e insolação permite a oportunidade de fazer crescer uvas de primeira qualidade, reduzindo os riscos de a cultura falhar e de custos elevados desnecessários tanto a nível do campo como a nível depois do processo de vinificação. Assim sendo o solo possui um papel fundamental na performance da cultura, na sobrevivência da vinha, nos custos de produção e rentabilidade e na qualidade potencial do vinho.

### 2.3.1 - Regiões vitivinícolas de Portugal

A produção de vinho em Portugal encontra-se dividida em várias regiões vitivinícolas como se pode observar no mapa de Portugal que demonstra a delimitação das 29 regiões com Denominação de Origem Controlada (D.O.C.) e as 14 regiões com Identificação Geográfica (I.G.) (ver figura nº 9).

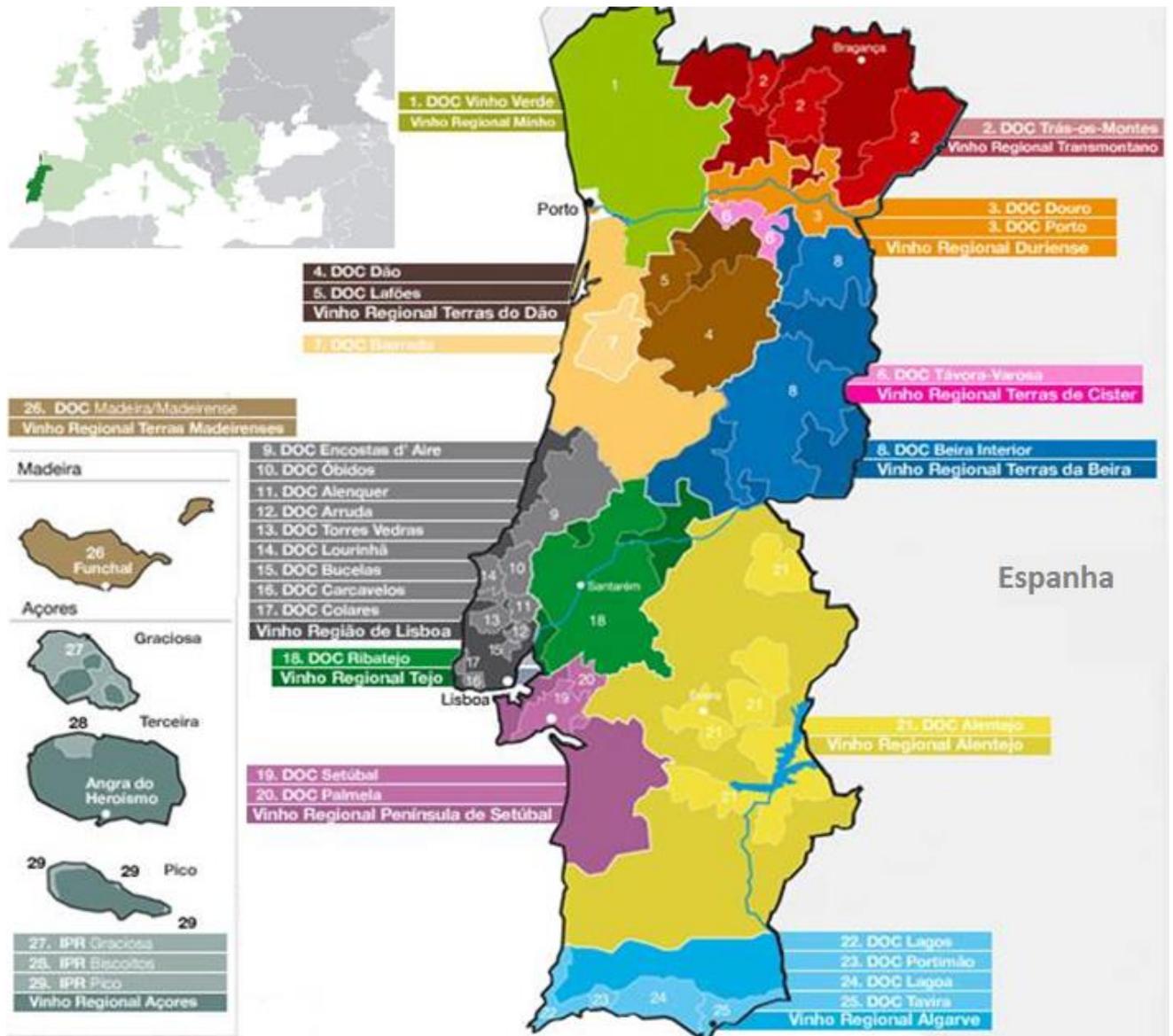


Figura 9- Localização de Portugal adaptado do IVV

### 2.3.2 -A região vitivinícola do Alentejo

Os vestígios de grainhas de uva nas ruínas de São Cucufate (Vidigueira) e lagares romanos que datam do período romano assim como documentos escritos sobre o plantio da vinha que datam do século XII demonstram a longínqua tradição vitivinícola em Portugal. Os processos de vinificação verificados nos anos 50 eram uma herança dos processos Romanos, como a fermentação feita em grandes talhas de barro. (Silva, 2013)

O Alentejo tem um enorme potencial vitivinícola, atualmente produz cerca de 20% da produção nacional, isto é cerca de 1221867 hL no entanto esta região nem sempre contou com o apoio das políticas agrícolas nacionais, porque devido aos solos pobres, às especificidades do clima, durante alguns anos as principais produções do Alentejo foram os cereais, a oliveira e o gado (IVV- Instituto da Vinha

e do Vinho, 2015). Nos anos 50, foi criada a primeira adega cooperativa da região assim como associações do sector mas só em 1988 conseguiu a sua denominação oficial sendo que atualmente os vinhos alentejanos contam com merecida notoriedade a nível nacional e internacional.

A região alentejana expande-se por 30.00 km<sup>2</sup> tendo como limite a sul as serras do Caldeirão e Monchique (fronteira com o Alarve), a Norte o rio Tejo, a noroeste NW pela Estremadura, a Este por Espanha e a Oeste pelo oceano Atlântico. Esta região subdivide-se em Alto Alentejo, Alentejo central, Alentejo litoral e Baixo Alentejo (figura nº 10).

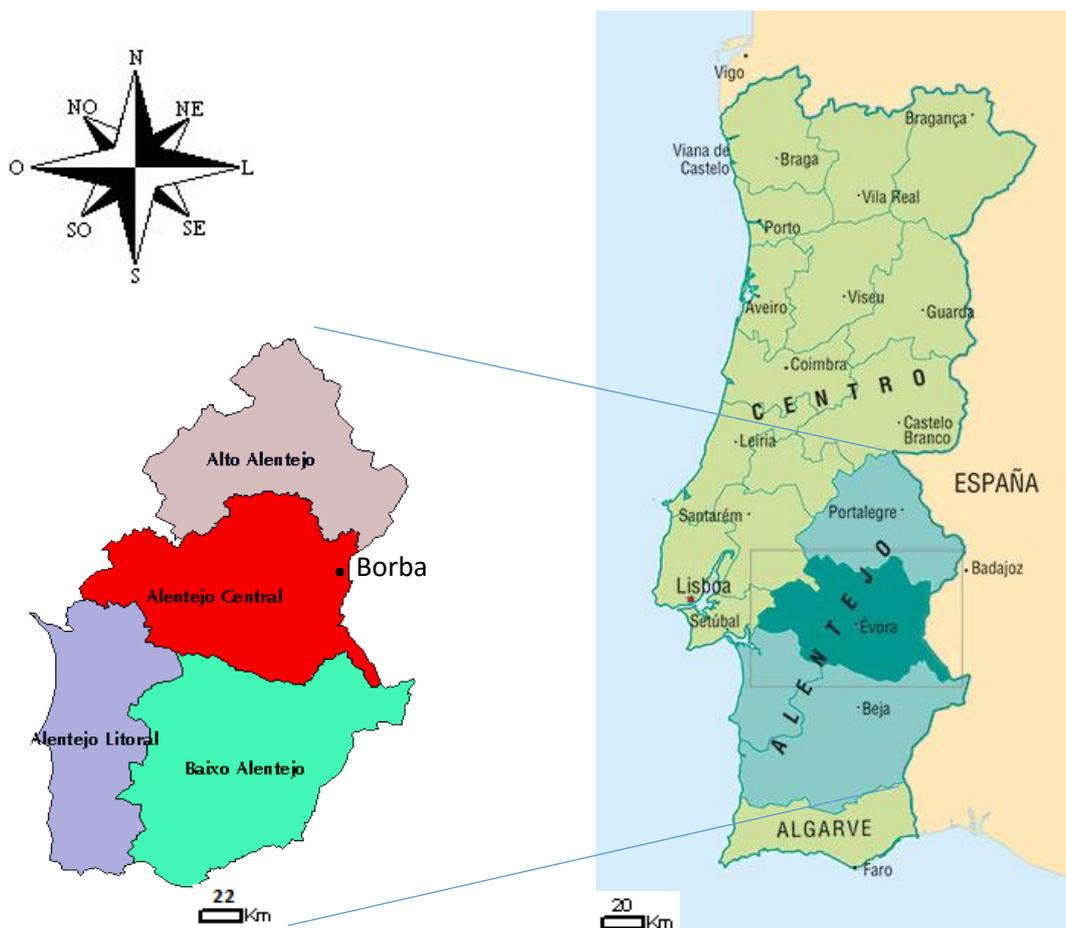


Figura 10 -Mapa de Portugal com destaque para a região do Alentejo

Nesta região é o clima mediterrâneo que predomina, apresentando elevadas amplitudes térmicas anuais, com Verões muito quentes e secos onde a insolação efetiva se encontra na ordem das 3.000 horas/anuais, verificando-se uma concentração das chuvas durante o Inverno, sendo aqui que as sub-regiões mais se diferenciam, verificando-se cerca de 800 mm anuais no litoral e Norte e 400mm a Sul e Leste (Magalhães, 2008).

Apesar da importância do sector vitícola nesta região e de se verificar uma expansão da área vitícola a cultura apenas representa 10.6% da área vitícola nacional, cerca de 23.188 ha (tabela nº 2 e figura nº 11).

Tabela 2- Área de vinha plantada em Portugal Continental («IVV- Intituto da Vinha e do Vinho», 2015)

<i>Região Vitivinícola</i>	<i>Área (ha)</i>	
	<b>DOP *</b>	<b>Total</b>
<i>Minho</i>	15 810	27 432
<i>Trás-os-Montes</i>	417	23 303
<i>Douro</i>	40 378	43 611
<i>Beiras</i>	8 370	52 670
<i>Lisboa</i>	1 074	22 425
<i>Península de Setúbal</i>	2 154	8 622
<i>Tejo</i>	1 161	15 653
<i>Alentejo</i>	10 090	23 188
<i>Algarve</i>	119	1 733
<b>Total</b>	<b>79 573</b>	<b>218 677</b>

Outro fator a salientar é o facto de os hectares de vinha no Alentejo nos últimos anos não terem sofrido nenhum aumento (figura nº 11). (IVV- Intituto da Vinha e do Vinho, 2015)



Figura 11 - Evolução da área de vinha na região vitícola alentejana

Esta região quente e seca tem atualmente beneficiado de alguns investimentos no sector vitivinícola que permitiu assim a produção de alguns dos melhores vinhos portugueses inclusive com reconhecimento internacional levando mais longe os vinhos alentejanos.

No Alentejo o relevo não apresenta um contraste tão marcado como noutras regiões produtoras, pelo que os factores de maior diversidade interna na região são: ondulado do relevo; variabilidade da litologia/geologia e a conjugação destes na diversidade dos solos que conjuntamente com os factores bióticos (porta-enxertos, casta) são os factores com maior potencial diferenciador de *terroirs*.

O *terroir* depende do solo, de factores edafo-climáticos (geologia, morfologia do terreno, microclima e cima), de factores bióticos e de factores culturais sendo assim um carácter distintivo do vinho.

Como esta região se estende desde Portalegre até à Vidigueira, existem solos com diferente natureza. Na zona de Portalegre predominam os solos de origem granítica com pequenos aglomerados de xisto, na zona de Borba, Redondo e Évora, estes são fundamentalmente graníticos e argiloso, já na Vidigueira verificam solos de natureza mais argilosa e por vezes calcária.

Factores como a posição meridional e a falta de relevos diferentes são responsáveis pelas características Mediterrânica e Continental do clima observado nesta região. A insolação tem valores bastante elevados, o que se reflete na maturação das uvas, o que permite uma maior acumulação de matéria corante e açúcares na película dos bagos. As vinhas localizam-se, na sua maioria, em substrato geológico de rochas plutónicas (granitos, tonalitos, sienitos e sienitos nefelínicos), sendo contudo de salientar a diversidade de manchas pedológicas nas quais as vinhas são instaladas (nomeadamente manchas xistosas e argilo-calcárias) (IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2015).

### 2.3.3 - Borba

A Região Alentejana encontra-se subdividida em oito sub-regiões nas quais se produzem vinhos DOC: Reguengos, Borba, Redondo, Vidigueira, Évora, Granja-Amareleja, Portalegre e Moura. (*Portaria n.º 296/2010 de 1 de Junho, 2010*)

No centro do Alentejo situam-se as sub-regiões de Borba, Reguengos, Redondo e Évora.

A sub-região de Borba que se encontra nos contrafortes a Norte da Serra d'Ossa é uma das mais antigas regiões com tradição vitícola (Magalhães, 2008). Nesta sub-região tem-se verificado uma precipitação elevada (inferior a Portalegre mas superior a outras sub-regiões do Sul) tendo a vinha que se adaptar a vários tipos de solo entre eles os mediterrâneos vermelhos ou amarelos, derivados de calcários ou calcários pardos, e vermelhos derivados de calcários cristalinos, com algumas manchas de xisto vermelho que marcam a viticultura e o carácter dos vinhos da sub-região (Magalhães, 2008). Borba é a segunda maior sub-região do Alentejo (Vinhos do Alentejo, 2015) e segundo a classificação climática de *Thorntwaite* Borba é sub-húmido seco, mesotérmico, com moderado excesso de água no Inverno e moderada eficiência térmica na estação quente (Magalhães, 2008) ou seja apresentam índices de pluviosidade levemente superiores à média, bem como níveis de insolação ligeiramente inferiores à média alentejana o que poderá proporcionar vinhos especialmente frescos e elegantes.

Pelas condições de secura que caracterizam a região os porta-enxertos utilizados são os 1108 Paulsen, o 99Richter e o 110 Richter (Magalhães, 2008). Os porta-enxertos são utilizados de modo a minimizar as consequências negativas que alguns solos apresentam de modo a promover uma melhor adaptação da planta a determinadas adversidades, como doenças. As plantas que deram origem às amostras utilizadas neste trabalho utilizavam principalmente os três porta-enxertos referenciados anteriormente: 99R, 1103P e o 110R.

## 2.4 - Porta enxertos

A técnica de enxertia apareceu com a luta contra a filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) passando esta técnica a ser obrigatória na viticultura. O porta-enxerto assumiu-se como um requisito bastante importante no desempenho e sucesso de uma vinha tanto ao nível da qualidade dos seus frutos (e consequentemente a qualidade do vinho) como ao nível da sua capacidade de produção, pelo que o porta-enxerto é fundamental na constituição de uma vinha e na execução da técnica da enxertia.

É certo que a vinha permite utilizar terrenos pedregosos, pouco férteis, onde a diminuta taxa de rendimento (onde poucas culturas seriam rentáveis) é compensada pela qualidade do fruto obtido. Contudo o melhor caminho a seguir, dentro do possível, é evitar terrenos mal drenados, expostos às geadas primaveris, solos com elevado teor calcário e sódio (solos salinos).

Normalmente os porta-enxertos induzem maior vigor, precocidade de produção e maior produtividade às copas em relação ao pé-franco. A escolha do porta-enxerto é extremamente importante na viticultura uma vez que desta escolha irá depender a produção, qualidade e longevidade da videira. Como a escolha do porta-enxerto é uma das mais importantes decisões de um viticultor, para a escolha do porta-enxerto ter-se-á que ter em conta quatro critérios. O primeiro critério é a resistência à filoxera em que a única exceção seria se o solo escolhido fosse arenoso em que a percentagem de matéria orgânica e argila não ultrapassa-se os 5%, o que não se verifica na região vitivinícola alentejana pelo que a resistência à filoxera é um fator importante a ter em conta na escolha do porta-enxerto. O segundo critério a ter em atenção é o vigor induzido por este porta-enxerto, de modo a evitar a perda de qualidade do fruto. O excesso de vigor deve ser evitado, tentando obter-se uma vinha com vigor moderado a baixo e para tal tem que se ter em atenção as condições edafo-climáticas do local. Em solos muito pobres não é aconselhável utilizar-se porta-enxertos de baixo vigor visto que neste caso as plantas poderão não atingir o vigor necessário para a obtenção de produções economicamente rentáveis. Como a maioria dos solos nesta região é fértil o porta-enxerto que se deve utilizar deverá ser de baixo vigor, visto que se pretende a produção de uvas de alta qualidade para a produção de vinhos finos. Os porta-enxertos condicionam o desenvolvimento vegetativo ao nível da copa. Ao ser de vigor baixo a moderado isto irá limitar o desenvolvimento da copa verificando-se reflexos positivos sobre a maturação e qualidade da uva. O terceiro critério é a resistência a nematodes, e nesta região deve-se ter em conta os porta-enxertos resistentes aos nemátodes do tipo *Meloidogyne spp* e *Xiphinema index*. Por último deve-se ter em atenção, e nesta região em particular, a

resistência à seca (durante o verão) ou ao excesso de água, a tolerância ao calcário ativo, a salinidade e ao pH do solo.

#### 2.4.1 - 1103 Paulsen

Este porta-enxerto encontra-se bem distribuído pelo Norte e Sul do país principalmente em zonas onde o clima favorece características tipicamente mediterrâneas (Magalhães, 2008). O porta-enxerto 1103 Paulsen é uma espécie interespecífica, criado por Federico Paulsen no ano de 1896, tendo derivado do cruzamento *Vitis berlandieri* e *Vitis rupestris* (*Berlandieri Résséguier* n.º 2 x *Rupestris du Lot*) é muito vigoroso, com resistência muito elevada à secura embora tolere muito bem a humidade no solo (Magalhães, 2008). O vigor transmitido por este é bastante importante, pois permite em conjunto com a formação de boas raízes, após o transplante, um rápido crescimento das novas plantações, contudo é importante controlar o vigor que este porta-enxerto incita para que não ocorram situações de baixos rendimentos causados pelo excesso de força/vigor. De modo a controlar o vigor de algumas castas com este porta-enxerto é necessário reduzir a dotação da rega ou incrementar o número de plantas por hectare aumentando assim a competitividade e forçando as raízes a crescerem em profundidade (Togores e Fernandez-Cano, 2011).

Este porta-enxerto suporta até 17% de calcário ativo e 30% do calcário total no solo. O 1103 P permite um elevado grau de resistência à filoxera radicular e também apresentam uma resistência média ao nematóide *Meloidogyne*. Este porta-enxerto, devido à elevada amplitude de tolerância hídrica, aumentou a sua importância nos últimos anos, sendo a segunda variedade mais procurada. O IPC (índice de poder clorosante) é 30, sendo que a sua resistência à clorose de ferro pode ser média. Para além disso este porta-enxerto permite uma boa absorção de magnésio do solo, e tolera bem os cloretos, conferindo-lhe assim uma maior resistência à salinidade do solo. Contudo é bastante sensível a deficiências em potássio e tolerante a deficiência em magnésio do solo. Este porta-enxerto adapta-se bastante bem a solos ácidos, característica esta que na região em estudo não tem grande importância. Em suma este porta-enxerto é bastante utilizado nesta região por ter capacidade para tolerar os solos húmidos durante a primavera e a sua tolerância moderada a alagamentos e por último devido ao facto de ter uma boa eficiência do uso de água na medida que permite maximizar o rendimento por hectare e proporciona uma boa percentagem de enxertia de campo, ao fim do primeiro ano.

Tabela 3 - Características do porta-enxerto 1103-P

<i>Característica</i>	<i>Intensidade</i>
<i>Vigor</i>	Muito vigoroso
<i>Produção</i>	Média/Alta
<i>Resistência à filoxera</i>	Suficientemente resistente
<i>Resistência aos nemátodos</i>	Média
<i>Resistência à seca</i>	Boa
<i>Resistência ao calcário</i>	17 a 19 %
<i>Resistência à salinidade</i>	Bastante tolerante
<i>Sensibilidade à humidade</i>	Moderadamente tolerante
<i>Sensibilidade à acidez</i>	Média
<i>Ação sobre o ciclo vegetativo</i>	Alguma (retarda um pouco)
<i>Índice de poder clorosante (IPC)</i>	30

NOTA:  $IPC \text{ (índice de poder clorosante)} = \frac{CO_3Ca}{Fe^2} \times 10000$

#### 2.4.2 - 99 Richter (99 R)

Este porta-enxerto derivou da *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris* (Magalhães, 2008). É um porta-enxerto muito vulgar nas novas plantações de grande parte das regiões vitícolas Portuguesas, pois adapta-se bem a solos difíceis, pedregosos ou não, mesmo que sejam bastante compactos (Infovini, 2015). Apresenta sensibilidade à fusariose e aos nematodes galícolas (género *Meloidogyne*), a sua produtividade pode ser exagerada em solos um pouco mais férteis, tende a atrasar a maturação das uvas e apresenta sensibilidade a texturas pouco equilibradas e à reação ácida dos solos muito vigorosos, adaptado a solos secos e de baixa fertilidade contudo deve evitar-se situações de reação ácidas o que em algumas castas pode significar uma diminuição das qualidades do mosto (Jackson, 2008; Magalhães, 2008; White, 2015). Boa resistência à secura e adapta-se bem a solos medianamente calcários (resistindo até cerca de 17% de calcário ativo). É desaconselhável em solos salinos, apresenta sensibilidade à humidade e a filoxera galícola (Infovini, 2015).

#### 2.4.3 - 110 Richter (110 R)

Grande difusão no país, encontra-se adaptado em regiões quentes e secas, solos pedregosos e de baixa fertilidade. Este porta-enxerto deriva do cruzamento da *Vitis berlandieri* Resseguier nº2 e *Vitis rupestris* Martin (Magalhães, 2008). Apesar de induzir produtividade elevadas nas castas onde é enxertado tal não tem diminuído a qualidade dos mostos. Como induz produtividade elevada não deve ser utilizado em solos férteis ou húmidos, onde pode provocar atrasos de maturação ou desavinho em castas mais sensíveis (Wolpert *et al.*, 2002). Estes porta-enxertos permitem o desenvolvimento

da planta em terrenos muito compactados devido ao seu sistema vascular vigoroso. Apresenta uma boa adaptação a solo pobres em Potássio (K), que nesta região não se verifica, e média sensibilidade à carência de Magnésio (Mg) (Riaz *et al.*, 2006). É moderadamente suscetível a nematodes galícolas (género *Meloidogyne*), não tolera a salinidade e resiste a teores em calcário ativo semelhante ao 99 R (17%) e o IPC é de 30 e a sua capacidade de enxertia é média. Em suma este porta-enxerto apresenta uma média tolerância à seca, moderada resistência a clorose, um grande vigor, um bom enraizamento e o ciclo vegetativo termina mais tarde (Jackson, 2008).

## 2.5 - Solo

As características do solo quando associadas aos factores climáticos e de relevo, determinam o tipo de cultura adequada para cada ambiente (Capeche, 2008). O solo é um conjunto de materiais minerais e orgânicos, água e ar, que não se encontram consolidados, geralmente localizado à superfície terrestre, com atividade biológica e é o meio natural para o desenvolvimento das plantas terrestres, tal como se formou ou, mais ou menos, modificado pelo Homem (Costa, 1991; Fassbender e Bornemisza, 1987). A grande variação destas combinações leva alguns a acreditar que o solo tem uma composição única para cada local/área. (James e Nordby, 2005)

Os factores de formação do solo são: o clima, os organismos, a rocha-mãe, o relevo e o tempo, aos quais se junta, muitas vezes, a ação do Homem, que utiliza o solo para as suas atividades (Costa, 1991; Fassbender e Bornemisza, 1987; Taiz e Zeiger, 2010).

O solo é maioritariamente constituído por matéria mineral sólida que se encontra, de profundidade variável, associada à matéria orgânica. Contudo por vezes o solo pode carecer de matéria orgânica, ou pelo contrário conter uma maior quantidade desta. Em qualquer dos casos contém proporções variáveis de água com substâncias dissolvidas (solução do solo) e ar (atmosfera do solo). (Cardoso, 1965; Reynier, 2002; Togores e Fernandez-Cano, 2011)

A parte sólida da matéria mineral compreende, em proporções bastante variáveis, fragmentos de rochas e minerais primários, e ainda minerais de origem secundária (minerais resultantes da alteração dos primários). Todos estes fragmentos ou partículas têm formas e dimensões variáveis, passando por pedras e cascalho até materiais tão finos com propriedades coloidais. (Costa, 1991; Jones *et al.*, 2013; Togores, 2006)

Relativamente à matéria orgânica do solo esta é constituída por restos de plantas e outros organismos, em estado mais ou menos avançado de decomposição (devido principalmente à atividade de um grande número de microrganismos existentes nela), incluindo substâncias no estado coloidal. (Costa, 1991; Magalhães, 2008)

Os solos que contêm mais de 20% matéria orgânica ou mais de 30%, em espessura superior a 30 cm, são chamados de solos orgânicos, enquanto que todos os restantes, que são os mais vulgares, designam-se por solos minerais (Costa, 1991).

O solo caracteriza-se pela composição, características e comportamento dos seus constituintes sólidos. (Cardoso, 1965)

A matéria mineral do solo contém principalmente oxigénio, silício, alumínio e ferro. Na maioria dos solos, os óxidos de silício, alumínio e ferro juntos constituem 90% ou mais do peso seco da fração inorgânica, dominando largamente o óxido de silício (50 a 75%). Já o cálcio, magnésio, sódio, potássio, titânio, fósforo, manganês, enxofre, cloro e outros elementos expressos nos óxidos, normalmente, menos de 10% do peso seco da fração mineral do solo. A percentagem de azoto total em relação ao peso seco do solo está situada entre 0,05 e 0,5%, sendo que, na maior parte dos casos, se situa entre 0,05 e 0,25%. (Costa, 1991; Fassbender e Bornemisza, 1987; Magalhães, 2008)

Quanto à parte orgânica dos solos é constituída, regularmente, por mais de 95% de azoto, 5 a 60% de fósforo e 10 a 80% de enxofre totais. (Costa, 1991)

O solo é constituído por três fases: (Magalhães, 2008)

- a fase sólida (matéria orgânica de diferentes tamanhos e formas correspondendo a cerca de 45% em volume)

- a fase líquida (água existente no solo, adsorvida nas superfícies coloidais ou retirada que se encontra retida no sistema de porosidade que por sua vez pode dissolver minerais que se tornam mais ou menos disponíveis na solução do solo para a sua mobilidade e absorção) (Epsteins e Bloom, 2006).

- a fase gasosa (“atmosfera do solo”: componentes da atmosfera e gases produzidos pelo próprio solo. Tem um volume variável visto que depende da atividade biológica do solo e da intensidade das trocas gasosas entre a atmosfera e o solo)

O solo é o reservatório de água, de macronutrientes (N, K, P, S, Mg e Ca) e de micronutrientes (como o Fe, B, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, Si, entre outros). A absorção de nutrientes pela videira depende do seu estado de nutrição, do equilíbrio entre elementos minerais no complexo de troca e na solução do solo, dos valores de pH (ver figura nº 19), da disponibilidade de água, do ambiente físico do solo (arejamento e possibilidade de expansão radicular) e por último a forma como este se encontram no solo (ver tabela nº 8). (Magalhães, 2008) A biodisponibilidade dos minerais é condicionada tanto pela forma química do metal como pela força de ligação do solo. (Fabani *et al.*, 2010)

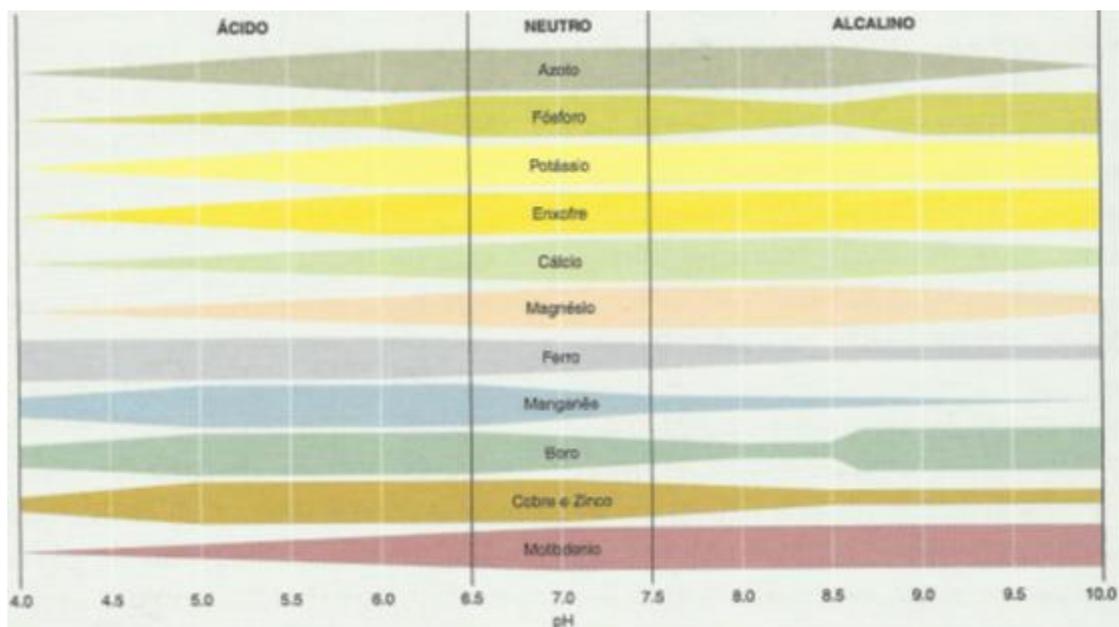


Figura 12 - Absorção dos elementos em função do pH. A grossura das barras determina a disponibilidade relativa de cada elemento (Magalhães, 2008)

Tabela 4 - Forma como os nutrientes (macro e micronutrientes) são absorvidos pela planta (forma assimilável pelas plantas)

<i>Nutriente</i>	<i>Preferencial</i>	<i>Eventual</i>
<i>Azoto</i>	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
<i>Fósforo</i>	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HPO}_4^-$
<i>Potássio</i>	$\text{K}^+$	-
<i>Cálcio</i>	$\text{Ca}^{2+}$	-
<i>Magnésio</i>	$\text{Mg}^{2+}$	-
<i>Enxofre</i>	$\text{SO}_4^-$	-
<i>Boro</i>	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$\text{H}_2\text{BO}_3^-$
<i>Cloro</i>	$\text{Cl}^-$	-
<i>Cobre</i>	$\text{Cu}^{2+}$	-
<i>Ferro</i>	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$
<i>Manganês</i>	$\text{Mn}^{2+}$	-
<i>Molibdênio</i>	$\text{MoO}_4^{2-}$	-
<i>Zinco</i>	$\text{Zn}^{2+}$	-

As exigências nutricionais da videira irão depender da sua expressão vegetativa e capacidade produtiva que por sua vez dependente da casta, porta-enxerto, compasso de plantação, sistema de condução e tipo de poda.

O conhecimento da composição química do solo é atualmente indispensável para se conseguir uma vinha em boas condições de produção e vegetação visto que irá permitir tomar as decisões mais corretas mesmo antes da instalação da vinha e escolher os porta-enxertos que melhor se adequam assim como o compasso e posteriormente as adubações e as correções necessárias. De uma forma geral os iões, após atingirem a raiz, serão transportados através do simplasto e do apoplasto até ao xilema (Taiz e Zeiger, 2010).

A carência de elementos minerais pode ter origem primária, ou seja esse elemento encontra-se em concentração deficiente no solo ou secundária devido a antagonismos iónicos durante a absorção ou devido a uma absorção seletiva que poderá derivar do porta-enxerto utilizado, e/ou da interação porta-enxerto/casta.

Os elementos minerais encontram-se no solo sob a forma de sais ou então devido à sua dissociação em aniões e catiões sob a forma iónica. Entre os catiões mais importantes pode-se destacar o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ . Os minerais obtêm a sua máxima concentração durante a fase herbácea diminuindo até a maturação da uva, principalmente o cálcio.

Tabela 5- Parâmetros estabelecidos para a fertilidade do solo usado pelo laboratório AGQ – *Labs & Technological Services*

<i>Elemento</i>	<i>Baixo</i>	<i>Alto</i>
<i>Potássio Disponível meq/1000g</i>	0,5	0,8
<i>Cálcio Disponível meq/100g</i>	8	12
<i>Magnésio Disponível meq/100g</i>	1,50	2,50
<i>Azoto mg/Kg</i>	2,45	2,85

Os nutrientes minerais ocorrem no solo quer dissolvidos na água, quer ligados a partículas do solo. No entanto, só uma pequena parte (<0,2%) está dissolvido na solução do solo. A maior parte (quase 98%) ou está ligada a detritos orgânicos – o húmus – e a partículas inorgânicas insolúveis, ou está incorporado nos minerais, constituindo as reservas do solo. Os restantes 2% estão adsorvidos nos coloides do solo. A solução do solo, os coloides e as reservas minerais do solo estão num estado de equilíbrio dinâmico que garante a reposição dos nutrientes (Larcher, 2003). Quer os coloides de ar-

gila, quer os orgânicos têm cargas essencialmente negativas, pelo que atraem essencialmente catiões. No entanto, também existem alguns locais carregados positivamente onde os aniões se podem acumular (Larcher, 2003).

As partículas coloidais do solo podem apresentar cargas elétricas negativas ou positivas e podem adsorver, por diferença de carga, catiões ou aniões. A absorção de nutrientes pelas plantas, a expansão e a concentração de argilas e a lixiviação também estão relacionados com a troca iónica. Como se pode observar na figura 20 os catiões estão adsorvidos na superfície da partícula do solo devido a esta estar carregada negativamente (Taiz e Zeiger, 2010).

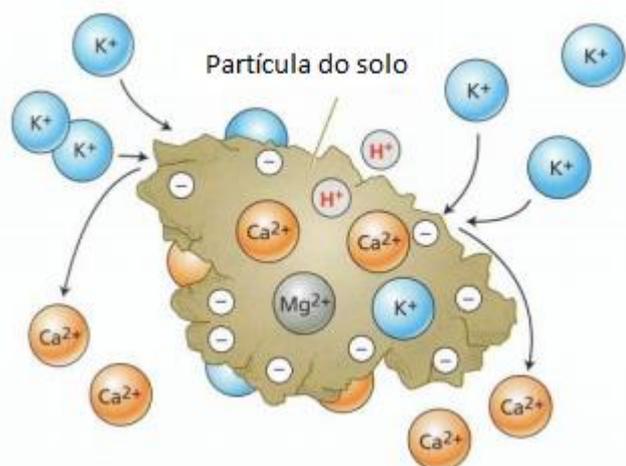


Figura 13 - Troca catiónica na superfície de uma partícula do solo (Retirado de Taiz e Zeiger, 2010)

Como as partículas coloidais do solo são geralmente eletronegativas as cargas são neutralizadas por catiões através de uma ligação entre a superfície das partículas coloidais e os catiões, adsorção catiónica. A capacidade de troca catiónica (CTC) demonstra a capacidade ou disposição de o solo reter e trocar íons positivamente carregados na superfície coloidal. A quantidade de catiões do complexo de troca no solo irá depender dos minerais, das superfícies específicas, das cargas do complexo coloidal e das características dos íons presentes na solução do solo. Esta capacidade que os íons têm de “trocar” reversivelmente com catiões idênticos ou diferentes, dissolvidos na solução do solo, dá o nome a estes íons de catiões de troca.

Os principais catiões do complexo de troca são o cálcio o magnésio, o potássio o sódio, o alumínio, o ferro, o manganês e o hidrogénio, e denominados como bases de troca encontram-se os elementos cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na) (Costa, 1991). As bases de troca são os catiões de troca dominantes nos solos de reação alcalina e neutra (Costa, 1991). Pensa-se que os catiões de troca estão em contínuo movimento em torno do seu ponto de ligação à fase sólida. Assim sendo quando um catião de solução se aproxima da superfície de adsorção quando um catião de troca está relativamente afastado desta, será imediatamente adsorvido em substituição do chamado catião de

troca. Atendendo ao mecanismo de adsorção catiónica, pode definir-se a capacidade de troca catiónica do solo como a quantidade de catiões necessária para neutralizar as cargas negativas de uma quantidade unitária de solo em determinadas condições, principalmente para um determinado pH.

As características qualitativas das uvas, mosto e dos vinhos para além dos processos de vinificação são também influenciadas pelo solo uma vez que este irá influenciar a sua composição relativamente ao teor de açúcares, elementos orgânicos e minerais, antocianinas, ácidos e polifenóis (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Outro fator a ter em conta é o património enzimático das castas utilizadas visto que este depende do perfil genético das castas. A atividade de cada enzima dependerá da quantidade dos microelementos existentes no solo uma vez que em cada molécula de uma enzima existe um grupo prostético com um microelemento (Taiz e Zeiger, 2010). Tudo isto demonstra a importância das análises ao solo.

Contudo as análises de solo apenas indicam os nutrientes disponíveis no solo não significa que estes sejam absorvidos pela planta, ou seja não permite verificar qual a taxa de absorção para a planta. Ao se recorrer a uma análise de solo ter-se-á que ter em conta os fenómenos físicos de precipitação ou de solubilização natural dos minerais, os fenómenos fisiológicos relacionados com a absorção, sendo que estes dependem do clima do solo, da densidade radicular e da heterogeneidade do perfil do solo (Jones *et al.*, 2013; Marschner, 1995). No caso das culturas perenes, este último fator pode traduzir-se num desajuste entre o perfil radicular e o perfil de nutrientes pelo que é necessário acompanhar sempre a análise de solo com a análise foliar.

Os minerais têm um papel importante no metabolismo das leveduras, uma vez que os mostos e vinhos fermentados, as leveduras consomem cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio e zinco, sofrendo as suas concentrações uma diminuição (Mozaz *et al.* 1999). Além disso a diminuição de cálcio e potássio pode também estar associada a uma menor solubilidade dos seus tartaratos a baixas temperaturas, metodologia utilizada para estabilização do vinho.

### 2.5.1 - Potássio

É um catião univalente, tem um raio iónico de 1,38 Å e é caracterizado por uma grande mobilidade nas plantas (Quelhas dos Santos, 1996). O potássio é absorvido sob a forma de iões  $K^+$  existentes em solução no solo e é muito móvel na solução do solo e no interior das plantas (Jones *et al.*, 2013). No interior da planta, regula o balanço iónico celular, contribui para a regulação estomática e transpiratória, para o transporte de hidratos de carbono (entra a folha e o cacho), contribui para a síntese de grandes moléculas (proteínas e amido), é um ativador enzimático (é um cofator de mais de 40 enzimas) e contribui para a síntese de ATP (Jones *et al.*, 2013; Marschner, 1995; Taiz e Zeiger, 2010)

Ao nível de regulação estomática, desempenha um papel relevante sobretudo em situações de stresse hídrico, uma vez que este é o principal elemento que regula a pressão osmótica nos vacúolos das células e promove o fluxo de água para o seu interior. Além disto o encerramento dos estomas é

condicionado pela perda de íons  $K^+$  nas células em proveito das células epidérmicas. (Basile *et al.*, 2003; Peuke *et al.*, 2002). Este íon é importante durante o processo de maturação da uva visto que pode contribuir para uma maior resistência a situações de seca e é necessário para a translocação e acumulação nos diferentes órgãos da videira, especialmente nos frutos, de hidratos de carbono recém-formados influenciando assim indiretamente a qualidade do vinho, pela sua ação sobre o valor do pH do mosto.

A carência de potássio pode ocorrer quando o seu nível no solo é insuficiente ou quando a relação  $K^+/Mg^{2+}$  é inferior a 2 ou quando em anos húmidos e num solo de textura ligeira o  $K^+$  é arrastado da camada superficial (onde é mais absorvível) (Quelhas dos Santos, 1996). As consequências desta carência irão refletir-se na diminuição do grau provável, do pH, das antocianinas e dos teores em  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  afetando assim as características organolépticas do vinho.

O excesso de potássio irá promover o dessecamento da rãquis devido à menor absorção de cálcio e magnésio. Visualmente começa-se por verificar umas manchas escuras sobre o eixo principal e na ramificação da rãquis, ocorrendo necroses do tecido. Esta consequência fará como que a circulação de seiva no cacho diminua. Quando o bago entra na sua fase de maturação irá existir uma maior transpiração e consequentemente uma maior perda de água o que com a interrupção no xilema e floema, devido ao dessecamento da rãquis, o bago irá murchar porque a taxa de transpiração é maior do que a taxa de reposição de água no cacho (Fráguas, Sônego, e Júnior, 1996; Mpelasoka *et al.*, 2003). Assim sendo o potássio exerce um papel importante na formação do *bouquet* do vinho. A sua carência irá produzir um menor teor de açúcar aumentando a acidez do mosto e uma diminuição da cor do bago e vinho, enquanto que o excesso irá reduzir a acidez do mosto.

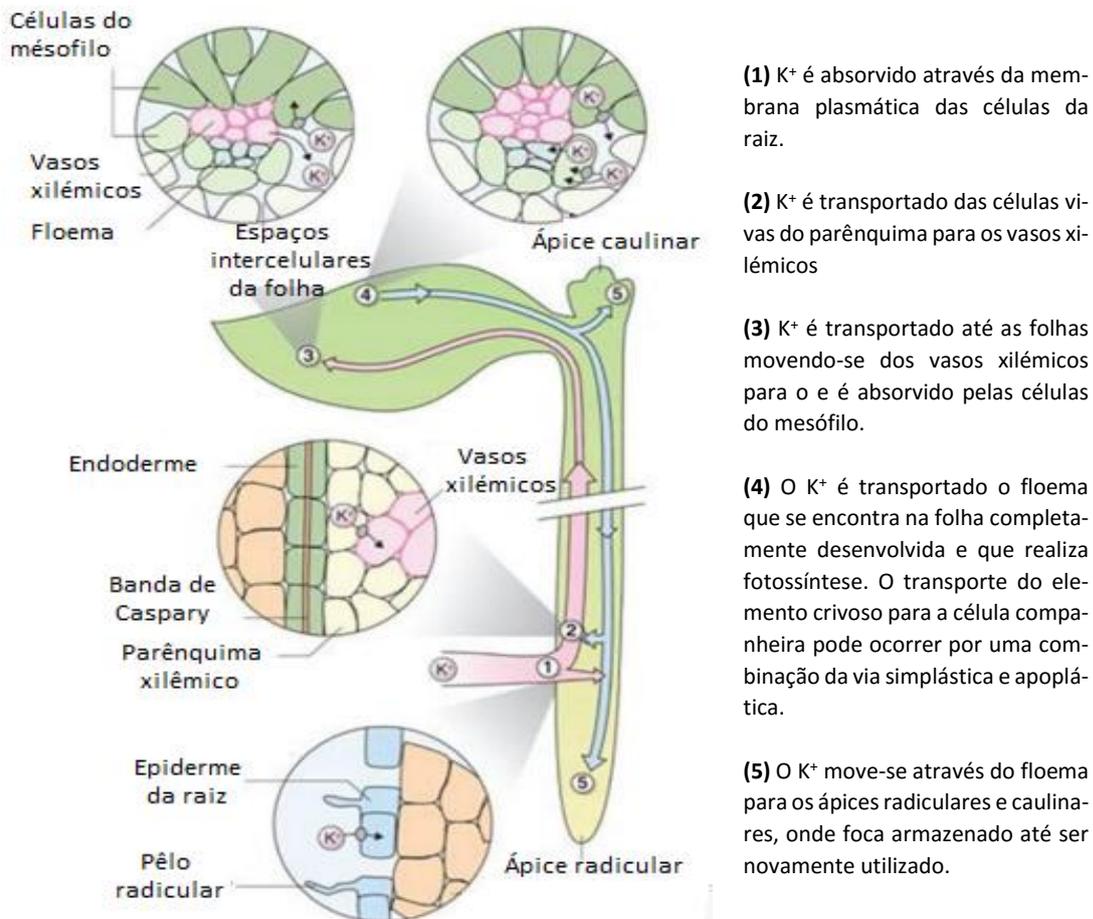


Figura 14- Transporte do  $k^+$  para a planta e no seu interior (adaptado de Jones *et al.*, 2013)

### 2.5.2 - Cálcio

Quando cristalino o raio iónico do cálcio é de 0,99 Å enquanto que o raio do ião hidratado é de 4,13 Å (Marschner, 1995). O cálcio é absorvido pela videira sob a forma de ião  $Ca^{2+}$  que derivou dos carbonatos, sulfatos e cloretos que se encontram no solo. A taxa de absorção do cálcio é menor que a do potássio porque a absorção do cálcio é feita unicamente nas raízes jovens, onde as paredes celulares da endoderme não foram ainda suberizadas, sem estrias de *Caspary*.

Este elemento entra maioritariamente na planta por difusão e pode-se encontrar na estrutura das paredes celulares (é constituinte da lamela média) sob a forma de pectatos logo verifica-se a sua maior concentração nos órgãos verdes da videira, sendo bastante importante durante o crescimento dos órgãos subterrâneos e dos órgãos aéreos (principalmente do ráquis do cacho).

O cálcio mantém a integridade celular (a capacidade de se ligar aos grupos carboxilo dos polissacarídeos pécnicos da lamela média confere-lhe uma função de estabilização na estrutura das paredes celulares (Demarty, Morvan e Thellier, 1984). O cálcio tem também uma função de manutenção da permeabilidade membranar através das ligações com os grupos fosfato e carboxilo dos fosfolípidos,

e com as proteínas localizadas à superfície das membranas (Marschner, 1995). É o elemento dominante do poder tampão intracelular regularizando o pH. Participa na ativação de alguns sistemas enzimáticos, visto que funciona como cofator de algumas das enzimas envolvidas na hidrólise do ATP e fosfolípidos e ativa algumas das enzimas envolvidas na mitose, na divisão celular e expansão celular. Para além de todas essas funções o cálcio estimula o crescimento radicular, o que irá potenciar a absorção de minerais (Portela e Louzada, 2007).

É importante salientar que o cálcio se desloca pelo xilema por trocas eletrónicas com o magnésio, zinco e manganês na superfície da parede do xilema e através da ligação aos polissacarídeos pécticos das paredes do xilema (Saure, 2005). É importante salientar que os grupos negativamente carregados de pectinas e lenhinas nas paredes das células do xilema tendem a impedir o movimento do cálcio em relação ao fluxo em massa do xilema (Jones *et al.*, 2013). O cálcio é levado pelo xilema até as folhas, onde permanece e se torna imóvel, ou seja, não há redistribuição do cálcio na planta. A relativa imobilidade do cálcio nas plantas pode originar a deficiência deste cálcio nos tecidos mais jovens e frutos. Um dos factores para os teores de cálcio serem menores no fruto do que no solo e nas folhas deve-se ao facto dos frutos apresentarem menores taxas de transpiração em comparação com as folhas (Ho, Hand e Fussell, 1987). Depois de absorvido na raiz, pela coifa, segue pela rota apoplástica até atingir as estrias de Caspary, onde entra na célula pela via simplástica. Essa entrada ocorre através dos canais de cálcio onde se verifica a bomba de prótons que liberta  $H^+$  para o lado externo da célula gerando assim uma diferença de potencial eletroquímico, o qual faz com que o cálcio entre na célula por meio dos canais. A absorção de cálcio pode ser diminuída pelo excesso de outros íões como o  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  e  $NH_4^+$  (Marschner, 1995).

### 2.5.3 - Magnésio

O magnésio é absorvido pela videira sob a forma de íon  $Mg^{+2}$  que se encontra na solução do solo (Coutinho, Ahlrichs e Magalhaes, 1984). Este neutraliza ácidos orgânicos e participa (como o potássio e o cálcio) no equilíbrio iónico intracelular e é muito móvel na planta. Dentro da planta faz parte do núcleo pirrólico (anel tetrapirrólico) da clorofila, da estrutura dos ribossomas (estabiliza as partículas ribossomais na configuração necessária para a síntese de proteínas), da estrutura das paredes celulares e ainda contribui na formação dos carotenos (Taiz e Zeiger, 2010). Este macroelemento permite ainda a ativação do sistema enzimático do metabolismo dos glúcidos, proteínas peroxidases e fosfatases. Em suma este catião é necessário na atividade de enzimas fundamentais na biossíntese dos ácidos nucleicos, fotossíntese e respiração. (Wolf e Cittadini, 2003; Wolf, Torsello, e Fasanella, 2003)

Após a sua absorção, o  $Mg^{2+}$  é transportado (pela forma ativa ou passiva), até ao xilema, e daí de forma passiva, para a parte aérea através da transpiração.

O magnésio devido a lixiviação que pode ocorrer na porção superior do solo é maioritariamente encontrado mais no subsolo, contudo em videiras mais jovens tal poderá ser um problema pelo que é essencial fazer análises ao solo nos diferentes extratos (Chekri *et al.*, 2012; Christensen, 2001). O

$Mg^{2+}$  entra nas células da raiz por via dos canais de  $Mg^{2+}$  da membrana plasmática e é transportado no xilema quer na forma livre quer em quelatos (Jones *et al.*, 2013; Taiz e Zeiger, 2010).

Pode verificar-se “secura do engaço” quando a razão  $k^+ / Ca^{2+} + Mg^{2+}$  é alta devido a existência de uma carência de  $Ca^{2+}$  e/ou de  $Mg^{2+}$  (Magalhães, 2008). É importante ter em conta que quando se observa baixas concentrações foliares de magnésio das videiras verifica-se também baixos valores de cálcio pelo que é importante monitorizar estes elementos para que não ocorra diminuição da qualidade do bago. (Portela e Louzada 2007)

#### 2.5.4 - Azoto

O azoto é um elemento dinâmico no solo que sofre processos de mineralização, imobilização e desnitrificação (J. Q. Santos, 1996). A quantidade deste elemento no solo depende do balanço entre o processo de mineralização e imobilização. Quando a mineralização é maior do que a imobilização, vai ocorrer um aumento da quantidade de azoto mineral no solo, caso contrário ocorre uma redução (Britto e Kronzucker, 2002; Brunetto *et al.*, 2006; Santos, 1996). A mineralização do azoto envolve dois processos, a amonificação ( $NH_4^+$ ) e a nitrificação ( $NO_3^-$ ).

A preferência para a absorção de  $NH_4^+$  ou  $NO_3^-$  irá depender da idade da planta e dos factores envolventes como o pH e a atividade biológica na zona radicular (Marschner, 1995). Quando a planta absorve um teor elevado de  $NO_3^-$  o pH das raízes aumenta uma vez que são excretados  $HCO_3^-$  e  $HO^-$  e ocorre absorção de cálcio, magnésio e potássio (Taiz e Zeiger, 2010). Quando absorve  $NH_4^+$  o pH das raízes diminui e como consequência a absorção de cálcio, magnésio e potássio diminuem (Hopkins e Hüner, 2008)

As três principais fontes de incorporação de azoto inorgânico no solo são: a) matéria orgânica do solo, b) azoto atmosférico e c) fertilizantes minerais azotados (Britto e Kronzucker, 2002; Gastol e Domagała-Swiatkiewicz, 2014)

O azoto é um elemento fundamental para o desenvolvimento da planta, afetando o crescimento vegetativo, a produção, a qualidade da uva e naturalmente do vinho, quer por falta quer por excesso, sendo assim importante monitorizar as suas concentrações no solo, na folha e no bago (Britto e Kronzucker, 2002; Brunetto *et al.*, 2006). Uma vez que a sua carência irá reduzir o teor de açúcares e a acidez total obtendo-se um vinho pouco aromático e o seu excesso irá fazer com que o teor de açúcares seja menor logo ocorrerá uma diminuição do teor alcoólico que posteriormente trará problemas com o envelhecimento do vinho verificando-se alguma turbidez.

O azoto é, depois do carbono, o segundo elemento mais utilizado pelas leveduras para o seu crescimento. O mosto da uva é essencialmente rico em constituintes nitrogenados (0,1 – 1g/L de azoto solúvel). O teor de azoto da uva depende da variedade e do porta-enxerto, do meio e das condições

de cultivo, e em particular da fertilização nitrogenada que diminui em caso de sobrematuração (Ribéreau-Gayon, Dubourdiou, Donèche, & Lonvaud, 2006b).

O teor de azoto é imprescindível para o bom funcionamento das leveduras. As leveduras existem naturalmente no solo, nas uvas, nos depósitos de fermentação e em todo o ambiente da adega. O azoto contribui para a biossíntese das proteínas celulares (azoto amoniacal e aminoácidos) pelo que se deve quantificar o azoto assimilável do mosto e se esse valor for menor que 150 mg/L deve-se adicionar dihidrógeno fosfato de amónio, ou sulfato de amónio, tendo sempre em atenção que a dose máxima regulamentar é de 30 g/hL. O azoto deve-se adicionar no início da fermentação, aquando do arejamento.

A fermentação alcoólica depende da disponibilidade de alguns nutrientes, presentes nos mostos, que são essenciais ao desenvolvimento das leveduras. O azoto apresenta níveis variáveis e em menor quantidade do que se necessita ao contrário, por exemplo, do açúcar que estão presentes em quantidades que excedem largamente as exigências nutricionais das leveduras. Por tudo isto o principal nutriente limitante da atividade das leveduras durante a fermentação, é o azoto sendo a sua baixa concentração a principal causa da ocorrência de fermentações amuadas ou lentas (Bisson, 1993; Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon, Dubourdiou, Donèche, & Lonvaud, 2006a). A determinação de azoto no mosto demonstra ser importante porque permite ter uma noção se será necessário ou não adicionar mais azoto para que a fermentação alcoólica ocorra sem problemas, sem paragens. Os resultados obtidos por Burin *et al.* (2015), demonstraram que a administração de azoto nos mostos pode ser usado como uma ferramenta para se obter vinhos de melhor qualidade, isto porque o azoto irá interferir na quantidade e formação de proteínas dos aminoácidos das leveduras e até nas próprias enzimas. Para além disso os vários aminoácidos existentes no mosto sofrem uma série de bio-transformações, dando origem a álcoois superiores, aldeídos, ésteres e ácidos cetónicos, compostos que contribuem para o aroma do vinho (Burin e Bordignon-Luiz, 2016; Soufleros *et al.*, 2003; Vilanova *et al.*, 2007). Os níveis iniciais de azoto assimilável (*YAN- Yeast Assimilable Nitrogen*), presentes nos mostos têm efeito sobre a formação de compostos voláteis formados pelas leveduras (Burin e Bordignon-Luiz, 2016; Vilanova *et al.*, 2007). A composição de azoto da uva pode afetar a cinética da fermentação (Varela, Pizarro e Agosin, 2004), afetando o crescimento, a taxa de fermentação, e a formação de produtos finais do metabolismo das leveduras (Barbosa *et al.*, 2009; Bell e Hebschke, 2005; Mendes-Ferreira *et al.*, 2009; Torrea *et al.*, 2011). Quando se verifica uma menor quantidade de azoto este será responsável pelo menor crescimento e formação das células de leveduras, provocando assim fermentações mais lentas e um desequilíbrio na composição aromática dos vinhos (Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). Tudo isto demonstra a necessidade de através de uma análise rápida saber o teor de azoto no mosto de modo a obter um bom desenvolvimento fermentativo consoante as necessidades específicas de cada estirpe de levedura que se for adicionar e num futuro próximo também quantificar os diferentes de aminoácidos disponíveis para suprir as suas necessidades.

No entanto, um mosto com um elevado teor de azoto irá originar vinhos com maior quantidade de azoto residual, o que provoca um risco de instabilidade microbiológica acrescido, devido à possível

formação de amins biogênicas e carbamato de etilo, que são compostos negativos para a qualidade do vinho (Cecchini e Morassut, 2010; Prete *et al.*, 2009; Alves, 1992; Moreno-Arribas, 2000) e para a saúde do consumidor em doses elevadas.

Contudo é importante salientar que o teor de azoto no vinho de base não apresenta ter tanto impacto como no mosto. Na segunda fermentação a escolha da levedura e a temperatura a que ocorre o processo são parâmetros mais importantes e que podem limitar o processo de vinificação. A levedura utilizada no vinho base irá afetar a cinética fermentativa e terá um maior impacto na qualidade final do vinho espumante. A segunda fermentação apresenta baixas exigências de azoto, contudo Martí-Raga *et al.* 2015, verificaram que vinhos com níveis extremamente baixos de azoto (0 e 17,64 mg/L), a segunda fermentação seria mais lenta, pelo que só aí se justifica a adição de azoto.

## 2.6 - Vinho produzido no Alentejo

A denominação de Origem (DO) Alentejo pode ser utilizada nas seguintes categorias: a) Vinho branco, tinto, e rosado ou rosé; b) Vinho licoroso; c) Vinho espumante de qualidade branco, tinto, e rosado ou rosé; d) Aguardente bagaceira; e) Aguardente vínica. (*Portaria n.º 296/2010 de 1 de Junho, 2010*)

No ano de 2014 a produção de vinho no Alentejo representou 23,5% da produção nacional cerca de 117986700 litros, Na tabela nº 4 pode-se verificar os diferentes litros produzidos consoante o tipo de vinho.

Tabela 6- Produção de vinhos DOC Alentejano e de regional Alentejano (em litros) no ano de 2014 (Vinhos do Alentejo, 2015).

<b>Vinhos DOC</b>	<b>Quantidade (L)</b>
<i>DOC Alentejano</i>	55318380
<i>Regional Alentejano (IG)</i>	62491460
<i>Regional Alentejano – Espumante</i>	71623
<i>Regional Alentejano – Licoroso</i>	1250
<i>DOC Alentejano – Espumante</i>	67095
<i>DOC Alentejano – Licoroso</i>	36880

As castas autóctones do Alentejo para as uvas brancas são o Arinto, Fernão Pires e Rabo de Ovelha, enquanto nas tintas são o Aragonês, Trincadeira, Castelão, Moreto e Alfrocheiro. Contudo as castas brancas mais importantes na região do Alentejo são a Roupeiro, a Antão Vaz e a Arinto. Em relação

às castas tintas, salienta-se a importância da casta Trincadeira, Aragonês, Castelão, Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon e Syrah (Infovini, 2015). Tal acontece porque para além dos vinhos DOC esta região também apresenta uma elevada produção e variedade de vinho regional o que permite aos produtores utilizarem outras castas para além das previstas na legislação de vinhos DOC. Tudo isso torna possível um vasto leque de castas nacionais e internacionais plantadas no Alentejo, sendo possível seguir as tendências dos novos mercados e responder às suas necessidades.

O vinho espumante nacional, embora tenha vindo a crescer nas últimas campanhas, ainda representa menos de 0,6 % do total de vinho produzido em Portugal, ou seja na campanha 2014/15 foi produzido 37.393 hL (figura nº 12) de vinho espumante, sendo que 78% era branco e só 22% era tinto/rosé. No Alentejo foi produzido 1,387 hL.

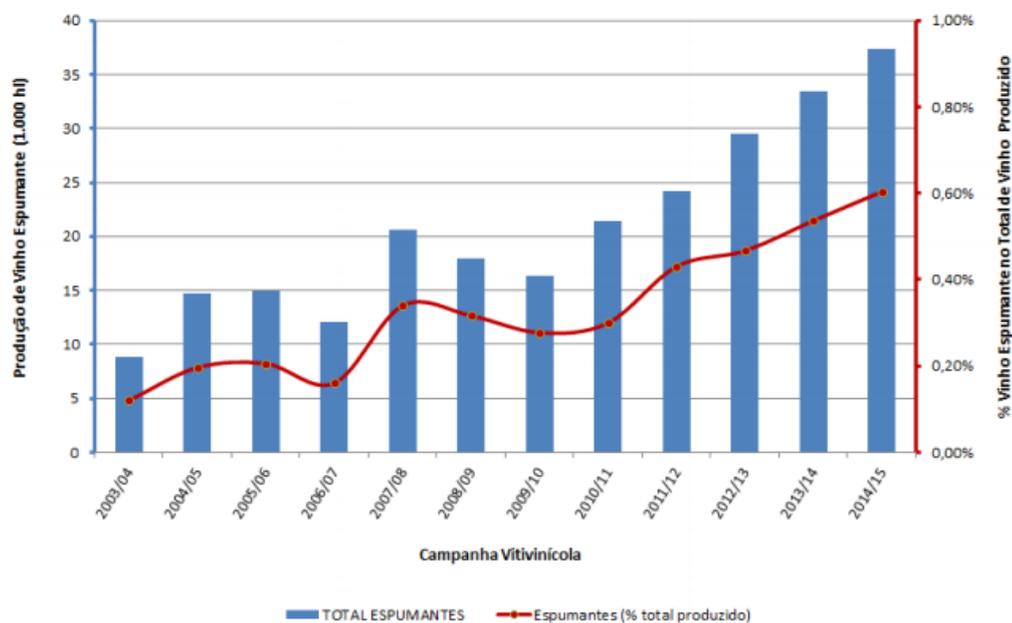


Figura 15 - Produção de espumante em Portugal e representatividade na produção nacional

### 2.6.1 - Vinho Espumante

Os Vinhos Espumantes de Qualidade Produzido em Região Determinada (VEQPRD) são vinhos que se diferenciam dos vinhos tranquilos (VQPRD) por ultrapassarem os 4 bar de dióxido de carbono. O vinho espumante geralmente é um vinho com acidez que apresenta teores de açúcar variáveis dependendo do tipo.

A sua elaboração pode fazer-se por diversos tipos de tecnologias:

- Método tradicional (champanhês)
- Método por transferência isobarmétrica (garrafa-cuba-garrafa)
- Método *Charmat* (em cuba fechada, descontínuo)
- Método contínuo

O método utilizado pela Adega Cooperativa de Borba é o método clássico. Com este método pretende-se vinhos finos equilibrados e subtis, o que os torna bastante sensíveis às oxidações, às reduções e à luz. Dos métodos referidos anteriormente, o método clássico, tem como objectivo obter vinhos brutos ou meio-secos, com acentuada subtilidade e aroma varietal (Jackson, 2008). É importante que durante a colheita se garanta a maturidade e a integridade dos cachos até chegarem à prensa.

Na Adega Cooperativa de Borba o espumante é feito a partir de uvas brancas de qualidade, normalmente da casta arinto, com um equilíbrio entre o teor de açúcar mais baixo em comparação com os outros vinhos produzidos na adega e a acidez mais elevada. Após a receção das uvas na adega, que foram vindimadas manualmente e transportadas em pequenas quantidades, estas são dirigidas para o esmagador e desengaçador, onde se procede a uma primeira sulfitação (adicionado sulfuroso), e de seguida para a prensa onde se obtém o mosto de lágrima. É importante que a extração do mosto ocorra a pressão muito reduzida e que o mesmo seja separado das películas imediatamente após o esmagamento para que não ocorra uma grande extração de componentes da película. Isto acontece porque a maceração pelicular, enriquece o mosto em compostos fenólicos, o que é indesejável num vinho base para espumante visto que posteriormente irá promover escurecimento, um amarelamento acentuado do vinho, antes ou após a tiragem. Após a prensagem segue-se a clarificação do mosto por decantação estática com temperatura controlada de 11 °C, tendo-se procedido à sua sulfitação com uma solução de dióxido de enxofre, durante vinte e quatro horas. Após a clarificação, o mosto é trasfegado para as cubas de fermentação, ao qual são adicionadas leveduras selecionadas, nutrientes e são feitas as correções de acidez necessárias. A primeira fermentação ocorre à temperatura de 16 - 20 °C, sendo de evitar temperaturas demasiado baixas, que originariam vinhos base demasiado ricos em ésteres aromáticos. Esta primeira fermentação termina com a transformação da maioria das oses (glicose e frutose, maioritariamente) em etanol e dióxido de carbono para os vinhos brancos, esta fase dura até 20 dias (Iannone *et al.*, 2015; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b; Zoecklein *et al.*, 2012).

Equação geral da fermentação alcoólica:



O vinho base para espumante deve ser organolepticamente neutro, sem oxidações e aroma limpo, pelo que antes do seu engarrafamento para a 2ª fermentação, deve-se recorrer a tratamentos de colagem, estabilização tartárica e filtração. Adiciona-se bentonite nos tratamentos de colagem (as doses variam entre os 25 g/hL a 30 g/hL) devido à interferência que as proteínas terão na persistência da espuma e principalmente devido a sua possível precipitação e consequente turvação do vinho depois de engarrafado, contudo, a bentonite não pode ser utilizada em excesso de forma a evitar uma desproteínização excessiva, que teria consequências ao nível da qualidade da espuma. Este vinho não deve conter uma elevada quantidade de substâncias proteicas e minerais devido as eventuais turvações e precipitações. No que respeita à quantidade de minerais, é necessária a sua eliminação ou estabilização para evitar os fenómenos de precipitação de Tartaratos de potássio e Cálcio. Para além disso deve ter um teor alcoólico entre os 9,5 % v/v a 10,5 % v/v (uma vez que na fermentação em garrafa o teor alcoólico irá aumentar em média 1,4% v/v), o açúcar total entre as 2 g/L, a

acidez volátil inferior a 10 meq/L ácido acético, a acidez total entre os 80-90 meq/L ácido tartárico, o dióxido de enxofre total inferior a 70 mg/L e o pH cerca dos 3,2 (tabela nº5).

No método tradicional ou *champenoise* o vinho branco após as fermentações em cubas de aço inoxidável, irá sofrer uma segunda fermentação em garrafa onde se terá de adicionar leveduras selecionadas e licor de tiragem. O licor de tiragem terá de ter a quantidade necessária de açúcares fermentescíveis, para a formação de dióxido de carbono suficiente para produzir a pressão mínima necessária, normalmente a 6 bar a 10°C, pelo que o vinho base terá de ter 24g de sacarose por litro. Este licor deve ser adicionado antes da colocação do vinho base na garrafa para que ocorra uma melhor homogeneização.

A escolha das leveduras a utilizar juntamente com o licor de tiragem é bastante importante para a qualidade do vinho espumante. As leveduras a utilizar devem ter características específicas como a capacidade de fermentação de vinho com teor alcoólico elevado, baixa ou nenhuma produção de compostos enxofrados, com tolerância a pressões elevadas (5 a 6 atmosferas), tolerante a baixas temperaturas (10 a 12 °C), baixa produção de acidez volátil, baixa aderência ao vidro, regularidade na cinética fermentativa e facilidade de remoção (Penacho, Valero e Gonzalez, 2012). Dentro da espécie *Saccharomyces cerevisiae* consoante a linhagem estas podem atribuir um caráter particular ao aroma de diferentes vinhos (Silva e Silva, 1987; Suárez Lepe, 1997). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* variedade *ellipsoideus* e variedade *bayanus* contêm as características anteriormente mencionadas e também produzem pouco sulfídrico. A adega Cooperativa de Borba utiliza leveduras *Saccharomyces cerevisiae bayanus* imobilizadas em cápsulas de alginato.

Tabela 7- Características desejáveis de vinho base para espumante (Carvalheira, 2012; Ribéreau-Gayon et al., 2006a)

<b>Características</b>	<b>Limites</b>
<i>Teor alcoólico</i>	9,5 – 11,5 % Vol.
<i>Acidez total</i>	6,5 g/L ácido tartárico
<i>Acidez volátil</i>	< 0,5 g/L ácido acético
<i>SO<sub>2</sub> Livre</i>	≤ 15 mg/L
<i>SO<sub>2</sub> Total</i>	≤ 100 mg/L

Para que a segunda fermentação ocorra em garrafa estas terão de suportar a pressão. A garrafa é capsulada com a vulgar cápsula de coroa e colocadas na horizontal, tendo de ser girada regularmente, *remuage*. A pressão interna da garrafa atinge 6 atmosferas.

Assim que a formação de espuma termina, as leveduras vão perdendo vitalidade e começa a ocorrer o processo de autólise das leveduras e consequentemente atividade proteásica e glicosidásica. Durante este período o vinho permanece em contacto com as borras e as leveduras vão libertando principalmente aminoácidos. É durante este período que ocorre uma grande evolução do sabor e do

aroma do vinho espumante, pelo que o período de autólise das leveduras determina as características de amadurecimento adquiridas pelo vinho (Lepe e Leal, 2004).

Após o tempo de estágio, devido a utilização de leveduras encapsuladas a etapa da *remuage* deixa de existir. As garrafas são posteriormente submetidas a baixas temperaturas (cerca de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e em seguida retiram-se os resíduos congelados devido a pressão que se liberta do interior da garrafa ao se retirar a rolha, *dégorgement*. Com este processo perde-se algum volume pelo que terá de ser completado com licor de expedição, que é constituído pelo próprio espumante, por uma solução sulfurosa para conservação e poderá conter açúcar, determinando se o champanhe produzido será bruto natural (até 3g/L), extra-bruto (até 6 g/L), bruto (até 12 g/L), extra-seco (de 12 a 17 g/L), seco (de 17 a 32 g/L), meio-seco (32 a 50 g/L) e doce (mais de 50 g/L) (*Regulamento (CE) N.º 607/2009 Da Comissão de 14 de Julho, 2009*). Este licor tem como objetivo melhorar as características gustativas para além harmonizar e suavizar o vinho espumante e permitir que este se conserve melhor. Após esta etapa o vinho encontra-se pronto para se colocar a rolha de cortiça definitiva, o *musselet* e ser comercializado (ver figura nº 13).

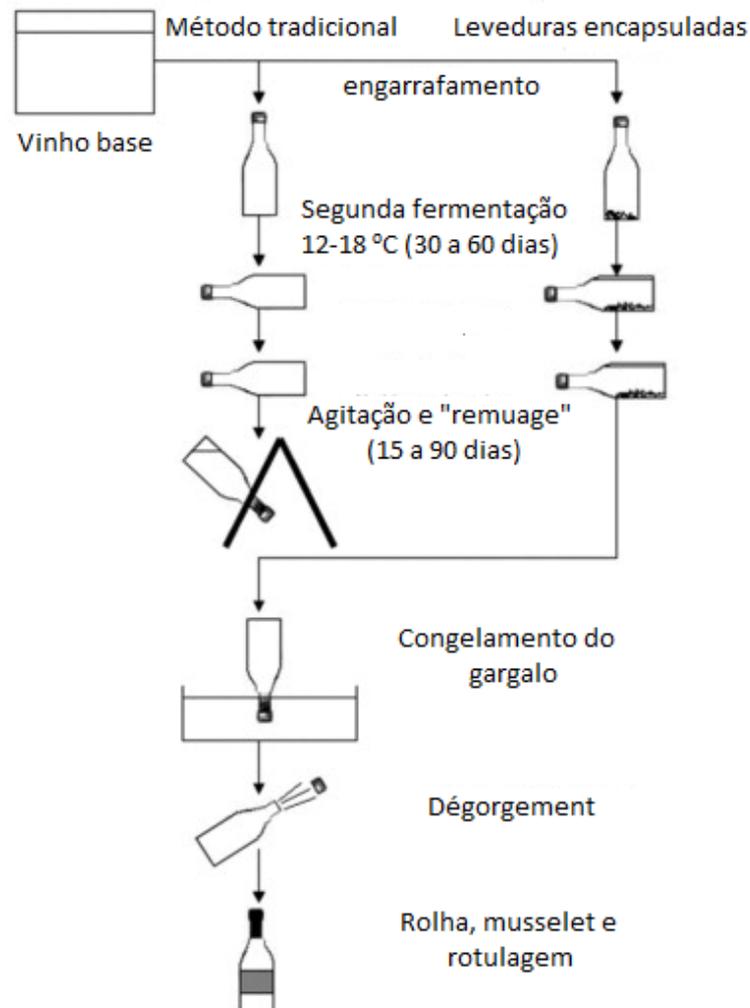


Figura 16- Esquema do processo de fabricação do espumante pelo método tradicional e pelo método das leveduras encapsuladas (adaptado de Torresi, Frangipane, e Anelli 2011)

As características do vinho espumante podem verificar-se na tabela nº 6. Neste tipo de vinho para além de se diferenciar devido ao dióxido de carbono, também se diferencia pelo seu teor em açúcares redutores (glucose + frutose). Como o dióxido de carbono aumenta a sensação de acidez do vinho, do ponto de vista organolético, diminui a sensação de doce de aí se explicar que o vinho espumante seco tenha cerca de 15 a 20 g/L de glucose/frutose enquanto um vinho tranquilo seco contém até 5 g/L.

Tabela 8- Características do vinho espumante (*Regulamento (CE) N.º 491/2009 do Conselho de 25 de Maio, 2009; Regulamento (CE) N.º 606/2009 de 10 de Julho de 2009; 2009, Regulamento (CE) N.º 607/2009 Da Comissão de 14 de Julho, 2009*)

<b>Características</b>	<b>Valores</b>
<i>Teor alcoólico (% v/v)</i>	10 – 13
<i>Acidez total (g/L)</i>	4,1 -9,75
<i>Acidez volátil (g/L)</i>	1,08-1,2
<i>Extrato seco (g/L)</i>	14
<i>Cinzas (g/L)</i>	1
<i>Dióxido de carbono (atm. a 20 °C)</i>	4
<i>Dióxido de enxofre (mg/L)</i>	≤185
<i>Teor em açúcares (g/L expressos em glucose + frutose): Bruto natural</i>	< 3
<i>Extra bruto</i>	0 - 6
<i>Bruto</i>	< 12
<i>Extra-seco</i>	12 - 17
<i>Seco</i>	17 - 32
<i>Meio-seco</i>	32 - 50
<i>Doce</i>	> 50

Os problemas que ocorrem nos vinhos brancos tranquilos podem ocorrer no vinho espumante, pelo que se pode verificar turvações microbianas, turvação proteica, turvações de cristais bitartaratos e turvações devido aos minerais.

## 2.7 – Proteína no vinho

A instabilidade proteica do vinho branco continua a ser um problema atual nas adegas. As proteínas existem em baixa concentração no vinho (15 a 300 mg/L) contudo podem afetar a sua limpidez e

estabilidade, e a limpidez deve ser uma característica permanente do vinho, daí a importância da estabilização proteica dos vinhos (Waters *et al.*, 2005). Quando ocorre a desnaturação das proteínas formam-se turvações e depósitos no vinho (Waters *et al.*, 2005) pelo que o vinho será rejeitado pelo consumidor visto tal fato ser considerado um defeito do vinho (Batista *et al.*, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a; Sauvage, *et al.*, 2010).

O teor de proteínas diminui durante a fase pré-fermentativa e durante a fermentação alcoólica devido à ocorrência das proteases que por hidrólise libertam péptidos e aminoácidos. A concentração de proteínas e a composição das frações proteicas presentes no vinho dependem das condições climáticas, da casta, estado de maturação das uvas e processo de vinificação (Fusi, *et al.*, 2010; Pashova, Güell e López, 2004; Sauvage *et al.*, 2010) uma vez que as proteínas do vinho provêm da uva e da autólise das leveduras, as *Sccharomyces cerevisiae* (Ferreira *et al.*, 2002). Sabe-se que as proteínas responsáveis pela turvação são as quitinases e as do tipo taumatina, as glucanases (Batista *et al.*, 2009; Sauvage *et al.*, 2010). É importante salientar que a precipitação proteica pode dever-se a alterações intrínsecas ou extrínsecas ao vinho, como a casta utilizada, o tipo de fertilizações utilizadas na vinha, o valor de pH do vinho, o teor de etanol, o teor de compostos fenólicos e a temperatura (Sarmiento *et al.*, 2000) e que mostos de uvas desengaçadas são mais ricos em proteínas uma vez que os taninos extraídos do engaço eliminam uma grande parte das mesmas, por precipitação.

Uma vez que alguns autores têm comprovado que a instabilidade proteica está em grande parte dependente da concentração de proteína total presente no vinho (Batista *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2002; Mesquita *et al.*, 2001) pelo que também se avaliou o teor de proteína total no vinho base.

## 2.8 - Leveduras Encapsuladas

No vinho espumante utiliza-se a imobilização de leveduras em microcápsulas de alginato de cálcio (figura nº 14).



Figura 17- Vinho de base com leveduras encapsuladas (retirado de Proenol, 2015)

A utilização de leveduras encapsuladas é uma tecnologia de imobilização celular. A imobilização celular é a utilização de um estrutura física de confinamento de células a um determinado suporte, preservando a sua actividade catalítica. A imobilização, tendo em conta o mecanismo físico utilizado pode-se dividir em quatro categorias: ligação a superfícies sólidas, o aprisionamento em matrizes porosas, a floculação e a contenção por membranas (figura nº 15) (Pilkington *et al.*, 1998).

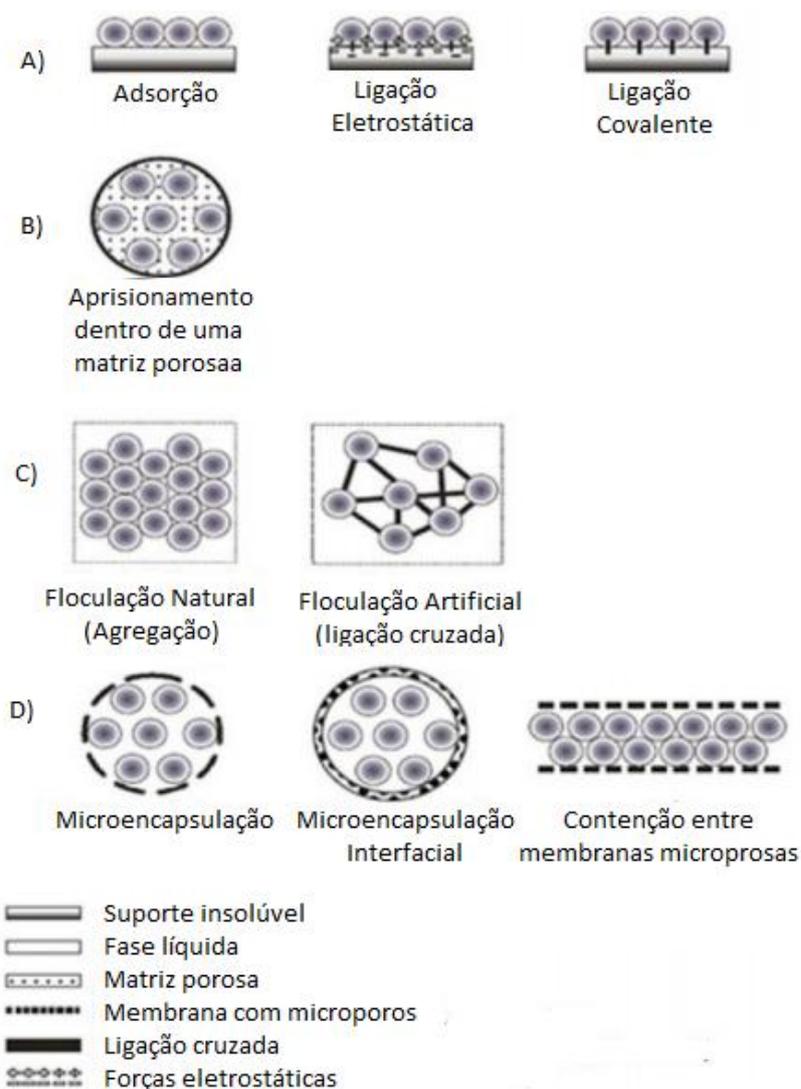


Figura 18 - Diferentes imobilizações celulares de microrganismos. A- Ligada a uma superfície sólida; B- Aprisionada em uma matriz porosa; C- Floculação; D- Contenção por membranas (adaptado de Kourkoutas *et al.* 2004)

A técnica de imobilização em alginato de cálcio é bastante utilizada na indústria alimentar devido a sua alta capacidade de retenção e preservação da viabilidade celular (Velings e Mestdagh, 1995). Para além disso o alginato é barato, não é tóxico, forma uma matriz altamente versátil e protege os componentes ativos do calor e humidade, aumentando assim a sua estabilidade e a biodisponibilidade (Funami *et al.*, 2009). Para além disso cumpre os seguintes requisitos: pureza de grau alimentício, não-degradável, disponibilidade, baixo custo e que se seja adequado para pH e temperatura baixos (Torresi *et al.*, 2011).

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas castanhas (*Phaeophyceae*) e é constituído por co-polímeros lineares inteiros constituídos por blocos de ácido  $\beta$ -D-manurónico por ligação (1 $\rightarrow$ 4) com o ácido  $\alpha$ -L-gulurónico. (Lee e Mooney, 2012; Puguan, Yu e Kim, 2014).

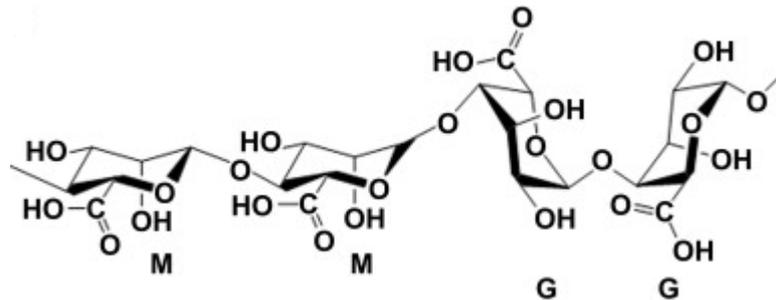


Figura 19 - Estrutura do alginato, onde M: Ácido manurónico e G: ácido gulurónico (adaptado de Pawar e Edgar, 2012)

Este polissacarídeo contém cargas negativas devido à presença dos ácidos D-manurónico e L-gulurónico que possuem grupos carboxilos na sua estrutura. Os iões divalentes como o cálcio ou o magnésio ligam-se a esses grupos carboxílicos devido à sua condição de polieletrólito formando ligações por pontes de cálcio, como se pode verificar na figura seguinte (Amsden e Turner, 1999; Serp *et al.*, 2000; Velings e Mestdagh, 1995). O cálcio vai-se difundindo até alcançar a cadeia polimérica, criando um reordenamento estrutural de onde resulta um material mais sólido com as características de um gel (Fang *et al.*, 2008; Grant *et al.*, 1973).

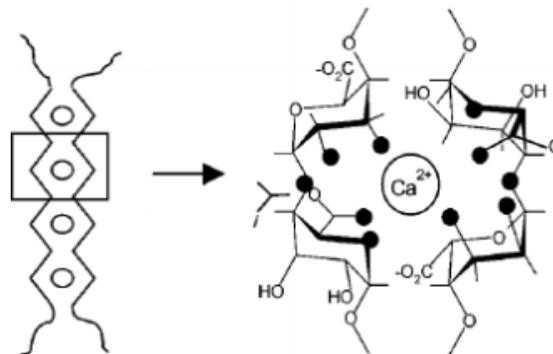


Figura 20 - Ligação do ião cálcio aos grupos carboxilos. (adpatado de Voo *et al.* 2016)

Segundo Amsden e Turner (1999) a composição e a sequência dos monómeros da molécula de alginato irão determinar a forma e a quantidade de agregações com certos iões divalentes como é o caso do cálcio e magnésio.

A gelificação do alginato ocorre, como já explicado anteriormente quando os catiões bivalentes participam na ligação entre cadeias do alginato dando origem a uma rede tridimensional em forma de gel. Os catiões ligam-se fortemente aos blocos -G (ácido gulurónico) das cadeias de alginato, uma vez que a estrutura dos blocos permitem um alto grau de coordenação dos iões bivalentes, sendo este

modelo designado por “Modelo da caixa de ovos”. A estabilidade e resistência desta estrutura depende do catião que se liga entre os blocos gulurónicos. Ou seja, por exemplo, o estrôncio por ter um raio iónico maior (1.92 Å) do que o cálcio (0.99 Å) irá formar estruturas mais resistentes que o cálcio, contudo a sua concentração no vinho é muito menor do que a concentração de cálcio, logo não é considerado um íon preocupante para o caso em estudo. Quanto ao magnésio, este já apresenta um raio iónico (0,72 Å) menor do que o cálcio logo a sua ligação ao grupo carboxilo não será tão firme como o do cálcio, razão pelo qual as soluções de alginato de magnésio não formam géis ou estruturas consistentes.

Uma vez que os catiões divalentes têm um elevado grau de coordenação/ligação aos blocos dos resíduos do ácido gulurónico das cadeias de alginato (Lee e Mooney, 2012) torna importante o controlo, em especial do teor de cálcio, de forma a garantir que o mesmo se encontre abaixo dos 80 mg/L no vinho de base ( tabela nº 7).

Tabela 9 – Características ideais para utilização de leveduras encapsuladas no vinho de base (Proenol, 2003).

<b>Álcool</b>	≤ 11,5% (v / v)
<b>SO<sub>2</sub> livre</b>	≤ 15 mg / L
<b>pH</b>	≥ 3.0
<b>Azoto assimilável</b>	≥ 100 mg / L
<b>Cálcio</b>	≤ 80 mg / L
<b>Estabilidade proteica</b>	Estável
<b>Estabilidade Tartárica</b>	Estável
<b>Temperatura de fermentação</b>	> 12 ° C

Para reduzir o risco de turvações e contaminação microbianas é importante que o vinho base se encontre dentro dos parâmetros anteriormente mencionados.

A figura nº 18 demonstra os aglomerados formados pelo alginato e os íões cálcio, que vai formando sucessivas camadas tornando o aglomerado cada vez maior e mais compacto.

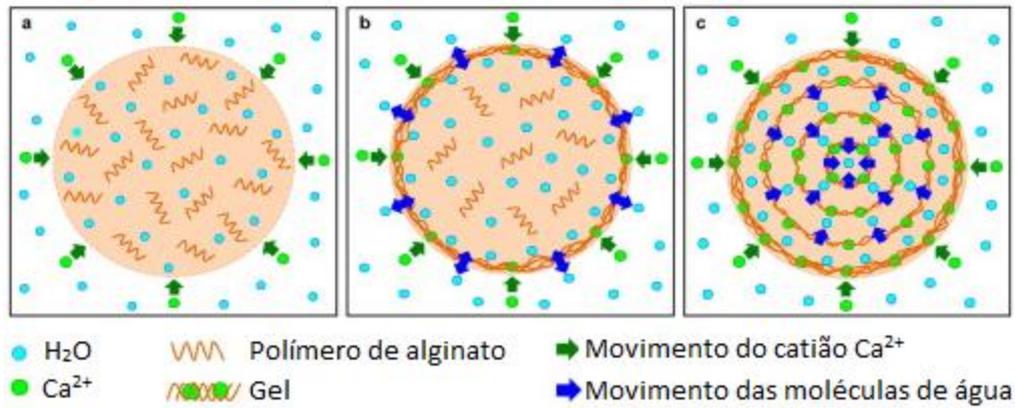


Figura 21 – Formação do hidrogel de alginato de cálcio

A concentração de cálcio, a força iónica e o pH da solução determinam a cinética da formação dos agregados de alginato, assim como o seu volume e estabilidade (Puguan *et al.*, 2014).

As cápsulas de alginato com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas pela Adega Cooperativa de Borba são adquiridas sob a forma de esferas desidratadas com cerca de 2mm de diâmetro, sendo que as leveduras imobilizadas têm origem em culturas isoladas da uva. Estas esferas de alginato, contêm as células de levedura duplamente encapsuladas. Após o término da fermentação, as esferas apresentam uma densidade maior do que o vinho e deslocam-se rapidamente para o gargalo da garrafa quando esta é invertida.

A utilização das leveduras encapsuladas apresenta várias vantagens (Jackson, 2008; Pozo-Bayón *et al.*, 2009; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006; Torresi *et al.*, 2011) quando comparadas com a utilização de leveduras livres como:

- ✓ Redução da mão-de-obra, tempo e espaço na cave devido à eliminação da etapa de “remuage”;
- ✓ Eliminação da etapa da preparação do inóculo, uma vez que as leveduras encapsuladas são adicionadas diretamente na garrafa sem haver a necessidade da preparação prévia do pé-de-cuba;
- ✓ Diminuição do risco de contaminação microbiológica, oxidação e perda de aromas, que podem acontecer durante a preparação do pé-de-cuba, que normalmente utiliza oxigénio;
- ✓ Permite dar uma resposta rápida às necessidades do mercado, visto que o planeamento da etapa do *dégorgement* pode ser feita imediatamente;
- ✓ Características organolépticas idênticas à fermentação com leveduras livres.

Na Adega Cooperativa de Borba o vinho espumante é realizado maioritariamente com duas castas, cv. ‘Arinto’ (*Vitis vinifera* L.) e cv. ‘Alvarinho’ (*Vitis vinifera* L.) e foram produzidas cerca de 5000 garrafas de Montes Claros Espumante bruto em 2014.

Quanto ao teor de minerais no vinho espumante este é resultante da composição inicial do mosto assim como dos produtos utilizados durante os tratamentos fitossanitários aplicados à vinha, assim

como das técnicas de vinificação utilizadas e das técnicas utilizadas para a formação de espuma (segunda fermentação em garrafa). Contudo devido às precipitações e ao equilíbrio químico entre os íons que asseguram a estabilização físico-química do vinho, ocorre uma diminuição dos teores de cátiões no produto final comparando com o mosto que lhe deu origem.

## 2.9 - Método analítico de referência

### 2.9.1 - Espectrometria de absorção atômica (EAA)

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na medida da interação entre a radiação eletromagnética e os átomos ou as moléculas do analito, ou ainda a produção de radiação pelo analito (Skoog *et al.*, 2006).

A espectrometria de absorção atômica e a espectrometria de emissão atômica foram os primeiros instrumentos a permitirem realizar técnicas de análise elementar. A espectrometria de absorção atômica (EAA) é uma técnica espectroanalítica capaz de fazer determinações quantitativas de elementos baseada na absorção da radiação por átomos livres no estado gasoso (Welz e Sperling, 1999).

A EAA é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para efetuar análises elementares, de elementos metálicos e metaloides, que se encontrem a baixas concentrações (Hollas, 2004; Welz e Sperling, 1999). Esta técnica baseia-se na medição da absorção de energia por parte dos átomos. Das várias variantes da EAA a que foi estudada neste trabalho foi a EAA por chama. Nesta técnica a amostra em solução, é aspirada como um aerossol e conduzida até a uma chama (neste o comburente foi o ar-acetileno) e é convertida em vapor atômico (Skoog *et al.*, 2006). Os átomos derivados da amostra aspirada são confrontados com uma luz produzida por uma lâmpada do elemento a quantificar (com um comprimento de onda específico), são elevados para um estado excitado e absorvem energia (Skoog *et al.*, 2006).

A radiação, de comprimento de onda característico do elemento em estudo, é emitida através do vapor atômico. Os átomos do elemento absorvem alguma desta radiação pelo que a quantidade de radiação absorvida por estes átomos é medida e usada para determinar a concentração do elemento na amostra em estudo.

A análise por absorção atômica depende da existência de vários componentes, os quais:

- **Fonte de radiação:** As lâmpadas usualmente utilizadas são de descarga de vapor, de cátodo oco (HCL- *hollow-cathode lamp*) e de descarga sem elétrodos (Skoog *et al.*, 2006). As lâmpadas utilizadas podem ser de um único elemento ou combinadas (analisam mais do que um elemento) (Butcher, 2013; Skoog *et al.*, 2006; Welz e Sperling, 1999). Neste estudo foram utilizadas lâmpadas de um único elemento e de cátodo oco que emitiram um espectro que analisado por um *software* determina a quantificação do elemento.

- **Modulador:** Existindo a necessidade de modelar a fonte de radiação de interesse com o objectivo de a radiação eletromagnética proveniente da chama não atingir o detetor e assim dificultar a quantificação do elemento, no equipamento utilizado, existe uma interrupção do feixe fazendo com que a radiação proveniente da lâmpada atinja o detetor na forma de um sinal modulado (intermitente) tornando-se assim possível o detetor reconhecer o sinal proveniente da lâmpada (Skoog *et al.*, 2006; Welz e Sperling, 1999)
- **Sistema de Atomização:** É este sistema que produz átomos em estado gasoso, os mesmos que irão absorver a radiação eletromagnética proveniente da lâmpada. Os constituintes deste sistema são: o nebulizador, a câmara de nebulização e o queimador (Amorim *et al.*, 2008; Gauglitz, Günter e Vo-Dinh, 2003). O nebulizador aspira a amostra a analisar e forma o aerossol que passa para a câmara de nebulização onde irá ocorrer a mistura do aerossol com os gases, o oxidante (ar) e o combustível (acetileno). A temperatura da chama varia consoante a proporção de gases que a constituem, para as condições utilizadas para este estudo utilizando como comburente ar-acetileno o intervalo de temperatura varia entre 2100 °C a 2400 °C. É importante salientar que o queimador tem de estar devidamente alinhado com o feixe de luz para assim maximizar a sensibilidade da técnica.
- **Monocromador:** É necessário isolar a radiação eletromagnética específica do elemento a analisar pelo que é necessário um monocromador que detenha fendas onde a radiação eletromagnética se disperse nos comprimentos de onda (Skoog *et al.*, 2006). Estas fendas deverão permitir o máximo de energia derivada da radiação específica do elemento em análise para que se possa obter um limite de deteção baixo. (Skoog *et al.*, 2006; Welz e Sperling, 1999)
- **Detetor e Amplificador:** A radiação incidente no detetor é detetada por fotomultiplicadores e é convertida em um sinal elétrico mensurável.

A figura nº 22 demonstra esquematicamente os constituintes da EAA, resumidamente a radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco (HCL) é encaminhada para o atomizador/sistema de atomização, sendo depois os feixes de luz direcionados para o monocromador e a radiação aí isolada é detetada pelo detetor de fotomultiplicadores (TFM) e amplificada e processada no processador de sinal e, por fim, direcionada para o computador.

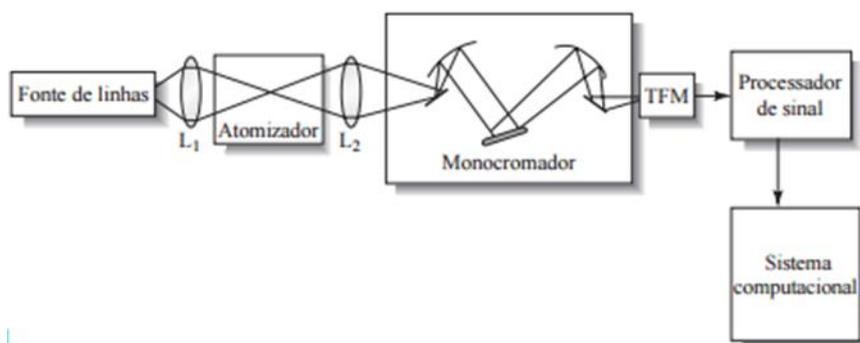


Figura 22- Esquema representativo da análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica por chama (adaptado de (Skoog *et al.*, 2006)

A espectrometria de absorção atômica fundamenta-se na absorção de radiação eletromagnética, na zona do visível e ultravioleta, por átomos neutros, no estado gasoso (isolados) e no estado fundamental.

Esta técnica é sensível a interferências químicas. O principal meio de minimizar ou mesmo eliminar interferências químicas é o uso de modificadores químicos que irão estabilizar o analito. Os modificadores químicos permitem remover as interferências de matriz. É desejável que a matriz seja mais volátil que o analito, para que durante a fase de pirólise todos os componentes da matriz da amostra sejam volatilizados e os átomos do analito permaneçam para poderem receber a radiação da lâmpada. (Boulding e Ginn, 2003; Zhang, 2007). Assim sendo, o principal objectivo do modificador químico é estabilizar o analito para altas temperaturas e remover os aniões interferentes antes da fase de atomização do analito. O exemplo mais comum para eliminar uma interferência química pela adição de um catião é a adição de lantânio tanto na determinação do cálcio como na determinação do magnésio, utilizando uma chama de ar/acetileno, uma vez que tem um elevado potencial de ionização e irá proteger o elemento a analisar para que este não se perca por complexação com outros elementos, o fosfato irá formar um composto mais estável com o lantânio do que com o cálcio ou magnésio (Dulude, Sotera, e Kahn, 1981; Kmetov, 2003).

### 2.9.1 - Métodos de análise comunitários de referência

O *Regulamento (CE) N.º 2870/2000 da Comissão, de 19 de Dezembro, 2000*, estabelece os métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas. Quando não se verificar a existência de métodos de análise comunitários de referência para a análise qualitativa e quantitativa de substâncias numa determinada bebida espirituosa, dever-se-á recorrer aos Métodos de análise validados internacionalmente que satisfaçam, em especial, os critérios estabelecidos no anexo da *Directiva 85/591/CEE do Conselho, de 20 de Dezembro, 1985* ou a métodos de análise descritos nas normas recomendadas pela Organização Internacional de Normalização (ISO - *International Organization for Standardization*) ou então aos métodos de análise reconhecidos pela Assembleia Geral da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV - *International Organisation of Vine and Wine*).

O *Decreto-Lei n.º 35846/46, de 2 de Setembro, 1946* que detém as bases do fomento da viticultura, o artigo 17º refere as características dos vinhos espumantes naturais, estes devem ter força alcoólica mínima de 11 graus centesimais e o máximo de 1 grama por litro de acidez volátil corrigida, expressa em ácido acético, o máximo de 60 miligramas de gás sulfuroso total. Enquanto que no *Decreto-Lei n.º 108/99, de 31 de Março, 1991* faz referencia aos métodos tecnológicos do vinho espumante no artigo 2º já mencionados anteriormente (2.5.1 - Vinhos Espumantes).

As características de um vinho DO vêm descritas no *Decreto-Lei N.º 212/2004 de 23 de Agosto, 2004* de modo a caracterizar o vinho neste estudo foram determinadas os seguintes atributos: a massa

volúmica, o título alcoométrico, o extrato seco, a acidez total, a acidez volátil, o pH e os açúcares redutores.

## 2.10 - Validação dos métodos analíticos

Para a validação do método, tem de se garantir que o laboratório cumpre os requisitos de ensaios e calibrações descritos na NP 17025:2007. O processo utilizado consiste em confirmar que o procedimento analítico utilizado para analisar um determinado parâmetro é adequado para o uso pretendido. Os resultados obtidos da validação do método são usados para avaliar a qualidade, fiabilidade e consistência dos resultados analíticos.

A NP EN ISO/IEC 17025:2007 salienta os requisitos gerais de competências técnicas para a realização de ensaios e/ou calibrações de métodos normalizados, métodos não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, incluindo amostragens. Esta norma define, também, que os laboratórios acreditados devem utilizar métodos validados na realização das análises e que as incertezas envolvidas nos resultados devem ser estimadas. Especificamente, a secção 5.9 da NP EN ISO/IEC 17025:2007, refere a importância da garantia da qualidade de resultados de ensaios e calibrações, uma vez que na execução dos ensaios e calibrações, todos os equipamentos e materiais de medida utilizados têm um erro associado e sem uma determinação quantitativa do erro a medição não tem significado analítico.

### 2.10.1 - Linearidade

A linearidade é determinada através de uma curva de calibração, sendo utilizado o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), para avaliar o grau de linearidade dos pontos experimentais, sendo que esse valor deverá andar perto de 1. (Morrison, 1990; Vinzi *et al.*, 2010)

Após a obtenção da curva de calibração ao se ler as amostras tem de se garantir que estas se encontrem dentro da gama de concentrações da curva de calibração. Para além disso todos os dias deve ser realizada uma reta de calibração e o seu respetivo controlo lendo sempre três padrões de controlo para confrontar com a reta obtida.

### 2.10.2 - Limite de deteção e quantificação

Os limites de deteção podem ser estimados através da equação nº 2

Equação 1- Limite de deteção

$$LD = \frac{3,3 \times s_0}{b}$$

Onde  $s_0$  representa o desvio padrão e  $b$  o declive da reta de calibração.

Os limites de quantificação foram estimados através da equação nº 3.

Equação 2- Limite de quantificação

$$LD = \frac{10 \times s_0}{b}$$

onde  $s_0$  o representa o desvio padrão e  $b$  o declive da reta de calibração.

### 2.10.3 - Exactidão

A exactidão corresponde à comparação do resultado experimental e o real valor do que se está a ser avaliada e expressa-se em termos de um erro relativo que pode ter um sinal positivo ou negativo (Ross, 1987)

Equação 3- Erro relativo

$$\text{Erro relativo} = \frac{(x - x_{ref.})}{x_{ref.}} \times 100\%$$

Onde  $x$  é a média de um conjunto de resultados experimentais e  $x_{ref}$  o real valor.

Este parâmetro está condicionado pelos erros sistemáticos. Os erros sistemáticos podem derivar de erros instrumentais, erros operativos, e erros de método. De modo a reduzir este erro é importante realizar ensaios em branco utilizar sempre a mesma metodologia na preparação das soluções padrão de calibração. A exactidão dos métodos analíticos estudados foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados (MRC) e pelo uso de ensaios de recuperação.

### 2.10.4 - Precisão

A precisão corresponde à concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo método várias vezes nas mesmas condições. Ao se falar deste termo ter-se-á de estudar a repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade avalia a variabilidade dos valores numéricos encontrados para a mesma amostra através das mesmas condições de ensaio. A reprodutibilidade avalia a variabilidade dos valores numéricos encontrados para a mesma amostra, em condições diferentes. É quantitativamente avaliada através do desvio padrão associado à média de um conjunto de ensaios independentes, sendo expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou *relative standard deviation* (RSD).

Equação 4- Desvio padrão relativo

$$\text{DPR} = \text{RSD} = \frac{s}{x} \times 100 \% \text{ (Roger e Nguyen, 1989; Ross, 1987)}$$

onde  $x$  é o valor médio do conjunto de resultados e  $s$  é o desvio padrão associado

É um parâmetro estatístico que calcula a incidência de erros aleatórios em um determinado resultado analítico. Quanto menor for o desvio padrão relativo, melhor a reprodutibilidade de um método uma vez que a dispersão dos resultados em torno do valor médio é mais reduzida. Para o método realizado o valor de aceitação foi de  $\leq 5 \%$  para os padrões e  $< 10 \%$  para as amostras.

### 2.10.5 – Taxa de recuperação

Consiste na adição do analito com concentração conhecida, e permite informação fiável sobre a existência de possíveis interferências de matriz.

Equação 5- Percentagem de recuperação

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_{\text{adic.}} - A}{P_{\text{adic}}} \times 100$$

onde  $A$  é o valor obtido para a amostra inicial,  $A_{\text{adic.}}$  é o valor obtido para a amostra reforçada e  $P_{\text{adic.}}$  é a concentração do padrão adicionado.

O critério de aceitação estabelecido para este parâmetro é regularmente entre os 95-105 %.

## 2.11 - Espectroscopia de Infravermelho

A química analítica permitiu a existência de métodos bastante eficientes e precisos para realizar análises qualitativas e quantitativas contudo grande parte desses métodos são bastante morosos, envolvem várias etapas, muitos deles tem um grande peso a nível económico e por último a maioria gera grandes quantidades de resíduos, tendo assim impacto negativo a nível ambiental. Atualmente com as novas tecnologia que se podem aliar à química analítica é possível desenvolver métodos de análises *in situ* sem necessidade prévia de pré-tratamento da amostra e que sejam métodos não destrutivos, rápidos e robustos contudo esses métodos necessitam de ser calibrados e validados com recurso aos métodos analíticos de referência.

Existe um número de razões para o grande sucesso e divulgação da espectroscopia de infravermelho. Este método é rápido, sensível, fácil de manusear e permite analisar amostras bastante diferentes (gases, líquidos e sólidos). Os espectros obtidos permitem uma avaliação qualitativa e quantitativa.

Normalmente um espectro de IV apresenta-se com valores de transmitância [% T] versus números de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ].

As características de um espectro de IV (Número de bandas de absorção de infravermelhos, assim como a intensidade e a sua forma) estão diretamente relacionados com a estrutura molecular de um composto. O espectro de IV pode ser considerado como uma impressão digital molecular de um composto (Griffiths e Haseeth, 2007; Hollas, 2004). A região IV compreende vibrações fundamentais dos átomos ligados. Sempre que tais átomos ligados vibram ao absorver energia infravermelha, exibem bandas de absorção de IV. (Perkins, 1986)

Os átomos que compõem as moléculas podem exibir comportamento vibracional que irá depender da sua massa e do tipo de ligação química. Esta característica faz com que as moléculas submetidas a radiações possam experimentar uma série de comportamentos inerentes às ondas eletromagnéticas, tais como absorção, refração, reflexão e espalhamento. Esses comportamentos são específicos dos átomos presentes na molécula, bem como da região do espectro envolvida, permitindo assim a identificação de compostos.

A radiação Infravermelha (IV), no espectro eletromagnético, encontra-se entre a radiação visível e as micro-ondas (figura nº 23), oscilando o seu comprimento de onda entre 780 nm e 100000 nm, (Gauglitz, Günter e Vo-Dinh, 2003; Griffiths e Haseeth, 2007; Hollas, 2004; Lima e Bakker, 2011; Luykx e Ruth, 2008; Perkins, 1986; Sun, 2009).

região do infravermelho (IV) é subdividida em três regiões: o IV-próximo (780 nm – 2500 nm) o IV-intermédio (2500 – 50000 nm) e o IV-longínquo (50000 nm – 1 mm) (Lima e Bakker, 2011; Skoog et al., 2006). Neste estudo a gama utilizada foi de 1100 nm a 2300 nm que corresponde ao IV-próximo (figura nº 23).

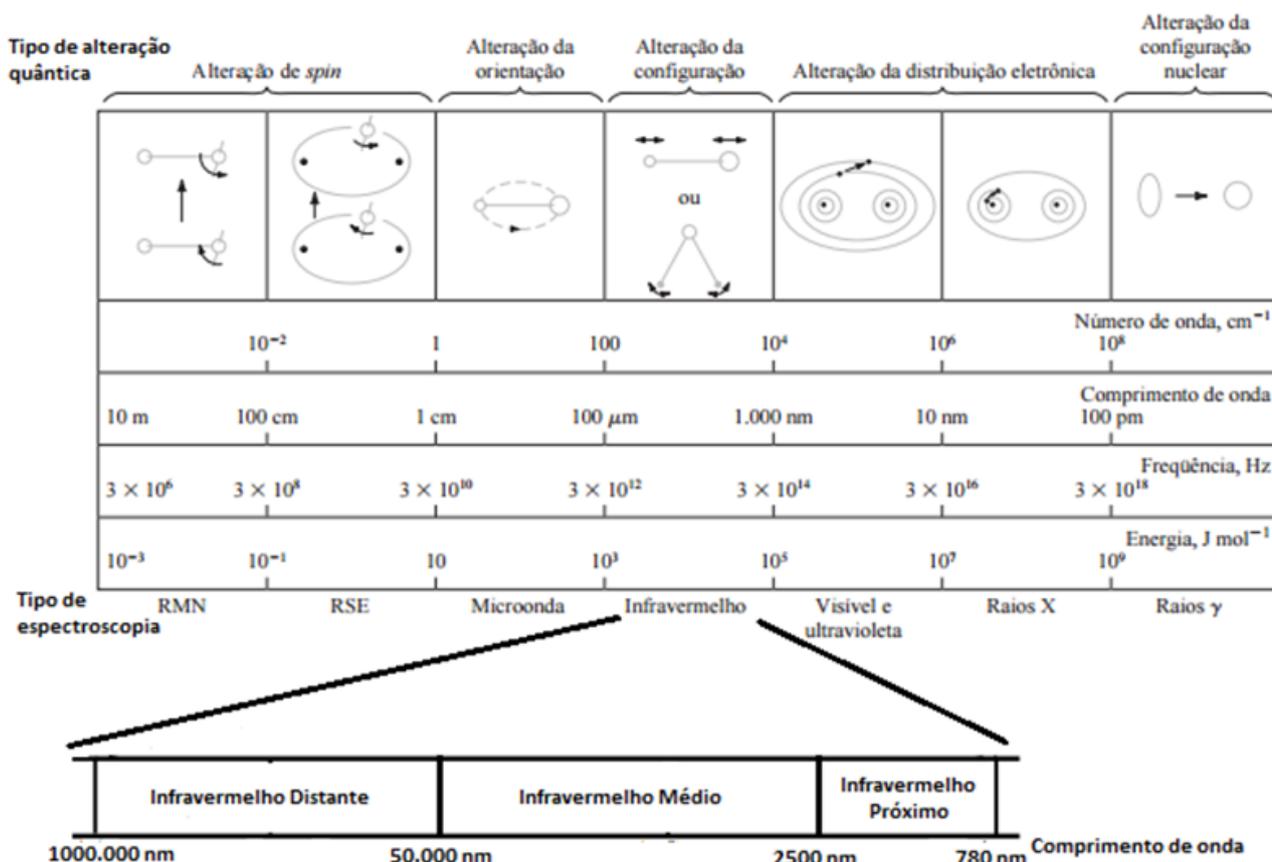


Figura 23-Espectro eletromagnético (adaptado de Skoog *et al.* 2006)

As regiões mais importantes do espectro de infravermelho abrangem as faixas de  $4000-1300 \text{ cm}^{-1}$  e  $900-690 \text{ cm}^{-1}$ . A região primeira região mencionada é de alta energia e é nesta região que se encontra os grupos funcionais, tais como as absorções de hidroxila de álcool (-OH), ácido carboxílico, fenol, enol, vibrações de -NH das aminas primárias e secundárias, o grupo carbonila entre outros. A ausência de bandas fortes na região de  $900-690 \text{ cm}^{-1}$  indica ausência de esqueleto aromático na estrutura. A faixa entre os  $1400-900 \text{ cm}^{-1}$  é conhecida como região da impressão digital, *fingerprint*, por ser muito importante para a determinação da estrutura uma vez que apresenta picos característicos da amostra.

### 2.14.3 - Espectroscopia de Infravermelho Próximo - NIR

A radiação absorvida permite que as moléculas passem do estado fundamental para um estado excitado, havendo absorção de energia correspondente à diferença de dois níveis energéticos vibracionais (Skoog *et al.*, 2006). Para compensar a baixa intensidade das absorções, esta região espectral dispõe de fontes de alta intensidade e de detetores eficientes, que contribuem para o aumento da relação sinal/ruído. A gama do infravermelho próximo cobre a faixa entre 780 e os 2500 nm (Nicolai *et al.*, 2007)

Como muitas moléculas apresentam sobretons (overtones) característicos que geram bandas de absorção nesta parte do espectro eletromagnético esta técnica permite fazer análises qualitativas e análises quantitativas, ou seja os espectros de absorção NIR podem ser utilizados para identificar espécies químicas, estimar concentrações e determinar propriedades físicas em misturas complexas. (Lima e Bakker, 2011; Ouyang, Zhao e Chen, 2015; Skoog *et al.*, 2006). Para que seja possível realizar uma análise qualitativa é necessário recorrer a uma biblioteca de espectros que irá permitir a identificação de substâncias puras e/ou a confirmação de misturas pré- definidas, para uma análise quantitativa é necessário criar modelos de calibração multivariada (Ferrer-Gallego *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2015). Os espectros gerados por esta tecnologia são complexos, e apresentam sobreposições e combinações das ligações CH, OH e NH dos grupos funcionais. A figura nº 24 apresenta as principais sobreposições e combinações existentes.

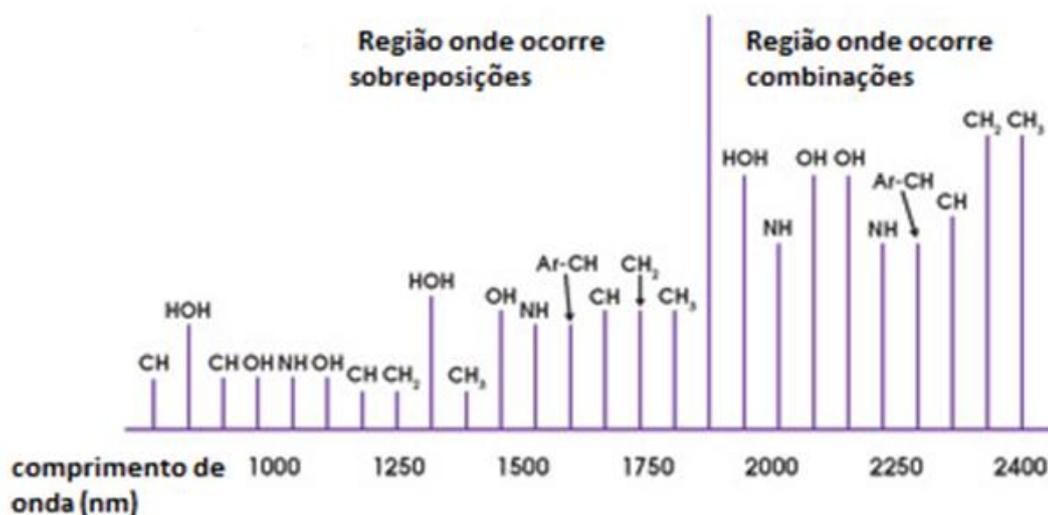


Figura 24- Sobreposições e Combinações de ligações características da espectroscopia de NIR (adaptado de Bergles e Yang 2009)

Devido a esta complexidade é necessário recorrer a métodos estatísticos e realizar uma calibração multivariada, com o objetivo de se obter um modelo matemático onde os múltiplos comprimentos de onda são relacionadas com uma ou mais parâmetros que se pretende analisar (neste caso a concentração de um determinado analito) (Gauglitz, Günter e Vo-Dinh, 2003; Pimentel, Galvão e Araújo, 2008).

A espectroscopia de NIR necessita essencialmente de uma fonte de radiação, um interferómetro e um detetor para analisar uma amostra. Como fonte de radiação a lâmpada de halogéneo com filamento de tungsténio é a mais utilizada (Luykx e Ruth, 2008). De modo a facilitar a análise do interferograma este pode ser transformado através da transformada de Fourier num espectro (frequências versus intensidade) (Perkins, 1986) pode também ser através de um monocromador ou através de filtros como o filtro sintonizável ótico-acústico (AOTF-NIR: *acousto-optic tunable near infrared*) que permite uma digitalização rápida do espectro, uma vez que, como se encontra totalmente no estado sólido, sem partes móveis, torna-se imune a mudanças de orientação, choques mecânicos e vibrações (Korablev *et al.*, 2004). Neste estudo o aparelho utilizado tem um filtro ótico-acústico (AOTF). O espectrômetro AOTF-NIR reúne dados espectrais a uma grande velocidade, até 16.000 comprimentos de onda por segundo (Korablev *et al.*, 2004) e permite modular a intensidade e o comprimento de onda de uma fonte (Tran e Lu, 1995). Este é um sistema cujo monocromador ou é um cristal de quartzo ou de óxido de telúrio ( $\text{TeO}_2$ ) acoplado a um dispositivo piezoelectrico, de tal maneira que o comprimento de onda difratado é função da radiofrequência aplicada ao cristal. Desta maneira realizando uma varredura numa determinada faixa de frequências gera-se um espectro correspondente da radiação difratada pelo cristal. No aparelho utilizado a tecnologia AOTF em que o cristal é de dióxido de telúrio ( $\text{TeO}_2$ ) permite obter comprimentos de onda em que o erro da repetibilidade é inferior a  $\pm 0,05$  nm. Para além desse aspeto a sua resolução fica entre 5 e 15 nm dependendo da faixa espectral utilizada, e apresenta uma alta taxa de transmissão da radiação monocromática (Pereira, 2006; Tran, 1997).

O AOTF baseia-se no princípio da mudança do índice de refração do cristal pelo efeito de ondas de ultra-som que nele se propagam. Um transdutor piezoelectrico é fixado no cristal e, ao ser excitado por um sinal de rádio frequência (MHz a GHz), produz ondas acústicas que se propagam no cristal e dão origem a uma modulação periódica no índice de refração do cristal. Este efeito gera uma rede de difração dentro do cristal de tal maneira que, para uma dada frequência das ondas acústicas, apenas um comprimento de onda da radiação incidente é capaz de satisfazer as condições de fase, de forma a produzir uma interferência construtiva. O cristal mais empregado é o  $\text{TeO}_2$ . Este material é anisotrópico (tem dois índices de refração), o que faz com que surjam dois raios difratados (um ordinário e outro extraordinário) que estão polarizados ortogonalmente e separados por um certo ângulo do raio não difratado, denominado raio de ordem (figura nº 25).

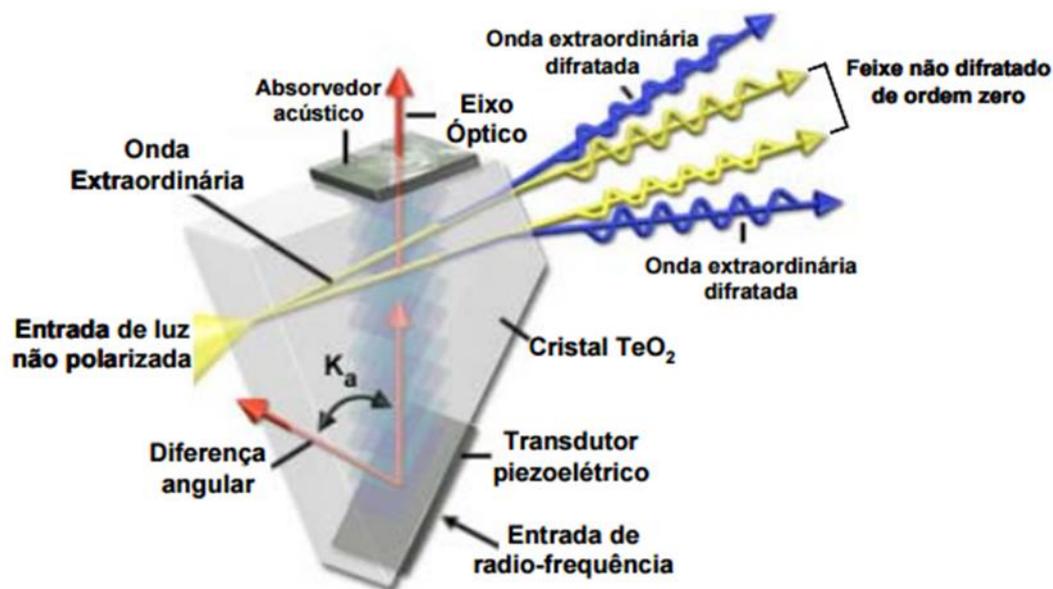


Figura 25- Filtro Óptico Acústico Sintonizável (adaptado de Matthew et al., 2015)

Relativamente ao detetor consoante a gama de comprimento de onda que se pretende deve-se escolher o detetor mais adequado, ou seja para comprimentos de onda baixos deve-se utilizar um detetor de silício já para comprimentos de onda maiores deve-se ter em consideração um detetor de sulfureto de chumbo (PbS) ou um de índio-gálio-arsénio (InGaAs).

Não existe um detetor detenha toda a gama NIR, o equipamento que se utilizou para este estudo está dotado de um detetor InGaAs, onde a gama utilizado foi dos 1100-2300 nm.

O detetor InGaAs (arseniato de gálio-índio) é um detetor de fotodíodos que é comumente usado para medir a potência ótica dentro da faixa do IV (NIR) apresentando alta sensibilidade e baixo ruído através de uma faixa espectral de 0,5 mm para 2,6 mm.

A tecnologia NIR é cada vez mais utilizada em análises no âmbito ambiental, na indústria de alimentos, na agricultura, na indústria farmacêutica e na análise de polímeros (Barbin *et al.*, 2015; Bergles e Yang, 2009; Cárdenas *et al.*, 2015; Ferrer-Gallego *et al.*, 2013; Gauglitz, Günter e Vo-Dinh, 2003; Porep, Kammerer e Carle, 2015; Sánchez *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2013; Sun, Cozzolino e Damberg, 2009; Sun e Dufour, 2009; Wu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013). No que se refere à análise das uvas, esta tecnologia tem sido também usada para determinar parâmetros como o glicerol, os sólidos solúveis, matéria seca, elementos minerais, açúcares, aromas e compostos fenólicos. (Fernández-Navales *et al.*, 2009; Ferrer-Gallego *et al.*, 2011; Ferrer-Gallego *et al.*, 2010; Ferrer-Gallego *et al.*, 2013; Kemps *et al.*, 2010; Zhengzong Wu *et al.*, 2016).

Entre todos os métodos espectroscópicos, a tecnologia NIR oferece a maior diversidade de instrumentação que ainda hoje se encontra em contínua mudança e crescimento. (Gauglitz, Günter e Vo-Dinh, 2003)

Ao se realizar uma análise através da espectroscopia de NIR, as moléculas que formam a amostra absorvem a radiação incidente e apesar de a absorção na região NIR ser baixa este facto permite que esta tecnologia seja utilizada em amostras contendo alto teor de humidade e inclusive privilegia as medidas de reflectância em amostras sólidas devido à alta penetração da radiação na amostra. Para compensar a baixa intensidade das absorções, esta região espectral dispõe de fontes de alta intensidade e de detetores eficientes, que contribuem para o aumento da relação sinal/ruído (Povia, 2007).

#### 2.14.3.1 - Vantagens do NIR

- Não necessita de pré-tratamento da amostra;
- É um método rápido;
- É um método não destrutivo e não invasivo quer para sólidos quer para líquidos;
- Não necessita usar reagentes, logo não produz resíduos;
- Por ser portátil e ser utilizado durante todo o processo produtivo, desde a receção de matérias-primas até ao produto final;
- Permite análises em ambientes hostis devido ao seu filtro ótico acústico;
- Os espectros podem detetar alterações ou impurezas no produto, não detetáveis por métodos analíticos convencionais;
- Manutenção reduzida, apenas a lâmpada necessita de ser substituída periodicamente.

#### 2.14.3.2 - Desvantagens do NIR

- Os espectros são pouco seletivos, pelo que têm de ser usadas técnicas quimiométricas adequadas aos dados;
- Tem de se criar modelos para cada parâmetro e matriz a analisar;
- A construção de modelos de calibração robustos e precisos pode ser complexa e difícil, sendo necessário um grande número de amostras para que se possam abranger todas as variações das propriedades químicas e/ou físicas;
- As amostras utilizadas para criar o modelo de calibração têm de ser analisados anteriormente por métodos de referência, o que poderá ser um grande investimento inicial para além do investimento do próprio aparelho NIR.

## 2.15 - Modelos de Calibração

As análises utilizando aparelhos de NIR sem qualquer calibração definida de fábrica seguem quatro fases: recolha de dados, processamento de dados, calibração e predição, sendo que estas duas últimas pertencem ao campo da quimiometria.

A recolha de dados é crucial para todo o sucesso de calibração do aparelho sendo vital a escolha correta das condições experimentais, das condições instrumentais e modo como se irá fazer a amostragem. Isto significa a escolha correta da gama de comprimentos de onda a estudar, a quantidade de sinal, a qualidade do sinal, o caminho ótico e por fim a escolha entre Transmitância, Transflectância ou Reflectância

A fase relativa ao processamento de dados é necessária quando os espectros apresentam algum ruído ou quando apresentam bandas pouco acentuadas, por exemplo. Estes pré-tratamentos possuem o efeito de redistribuir a informação contida no espectro de uma forma mais simples para correr a análise quimiométrica. Dentro desta fase os pré-tratamentos que mais se utilizam são: subtração ou normalização espectral, edição de comprimentos de onda, à média de sinal, correção de resposta do instrumento, correção da linha de base, cálculo de derivadas.

O equipamento NIR utilizado detém três *softwares* aplicativos, sendo o *Acquire* o *software* para fazer a recolha dos espectros onde se define todos os parâmetros a utilizar durante a leitura. O *software Prospect* que permite verificar todos os espectros recolhidos e retirar as primeiras impressões sobre os mesmos de forma a avaliar antecipadamente quais poderão ser os pré-tratamentos a realizar aos espectros. Por último detém o *Pred 32* que após se criar e seleccionar a calibração este *software* permite ler uma amostra e dar o resultado em segundos, trabalha em tempo real e também pode, através de um espectro obtido anteriormente, dar o resultado em conformidade com a calibração previamente seleccionada.

Para a qualificação e quantificação em NIR a análise multivariada contém vários algoritmos, como a análise de componentes principais (PCA), a regressão múltipla linear (RML), a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), a análise de Clusters, entre outros.

O *Unscrambler*®, versão 10.3, permite uma análise quantitativa de espectros com uma considerável sobreposição de bandas, como acontece na gama do infra vermelho.

O procedimento matemático e estatístico usado para relacionar medidas de uma propriedade física das amostras com parâmetros físico-químicos denomina-se por calibração. Este procedimento pode ser univariável ou multivariável, sendo que neste caso de estudo recorreu-se a uma calibração multivariável uma vez que cada espectro recolhido contém 1200 comprimentos de onda. Devido à elevada gama de comprimentos de onda que formam um único espectro é necessário trabalhar com

ferramentas capazes de extrair a informação fundamental sendo a ferramenta mais utilizada a quimiometria (Porep *et al.*, 2015).

### 2.15.1 - Quimiometria

A quimiometria é uma disciplina da área da química que aplica métodos matemáticos e estatísticos para delinear procedimentos experimentais de forma otimizada e assim obter a máxima informação química relevante dos dados obtidos (Ferreira *et al.*, 1999). Para a análise de dados muito complexos os métodos multivariados apresentam ser uma boa solução isto porque as calibrações univariadas apresentam algumas desvantagens tais como: as perturbações ou *outliers* causados por componentes desconhecidos não são reconhecidos porque a concentração do analito é determinada apenas num único ponto espectral. As flutuações estatísticas provocadas pelas interferências no detetor são diretamente refletidas nas concentrações obtidas. As calibrações multivariadas têm em conta as amplas características espectrais.

Quando todos os pré-tratamentos necessários aos espectros foram realizados a opção mais utilizada na literatura para criar um modelo de calibração é o PLS (Wold, *et al.*, 2001).

A regressão dos mínimos quadrados parciais - PLS (*Partial Least Squares*), é uma técnica que permite a análise de dados multivariados que relaciona uma ou mais variáveis (matriz Y) com diversas variáveis independentes (matriz X) que irão ser correlacionadas de forma a obter uma relação linear (baseada no uso de componentes principais) (Vinzi *et al.*, 2010). Esta técnica pressupõe um processamento matemático onde ocorre a determinação de duas matrizes que traduzem as variações espectrais e os valores de referência e os seus próprios vetores. Serão então estes vetores designados de componentes principais ou variáveis latentes que virão a ser utilizados na previsão da concentração da característica química ou física em estudo. Esta decomposição em componentes principais irá permitir compactar a informação dentro do espetro que melhor explica as variáveis em estudo permitindo a exclusão de dados resultantes do ruído do próprio aparelho (Wold, Sjöström e Eriksson, 2001).

Para otimização de modelo de regressão PLS pode-se recorrer a uma validação cruzada ou a uma validação externa. (Martens e Dardenne, 1998)

A validação cruzada exclui, um conjunto de amostras do conjunto de calibração, onde após a construção do modelo, se prevê o valor analítico dessas amostras de forma a minimizar o erro de previsão.

Após a validação cruzada, o método poderá ser testado através de um conjunto de dados independentes das amostras de validação. A validação externa é usada para verificar a exactidão, precisão e robustez do método ao longo do tempo.

Após a obtenção dos parâmetros do modelo de regressão é necessário avaliar a qualidade deste antes de empregá-los na predição de amostras desconhecidas. Os desvios entre o valor real do parâmetro de interesse e o valor estimado pelo modelo é a base das equações utilizadas. A raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC – *Root Mean Squares Error of Calibration*), é um parâmetro que incorpora erros aleatórios e sistemáticos do modelo (Chau *et al.*, 2004).

Contudo o RMSEC depende do número de fatores escolhidos, ao se aumentar o número de factores pode ocorrer um sobre ajuste do modelo, portanto é adequado usar métricas como a raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (*Root Mean Squares Error of Cross Validation*, RMSECV) e raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (*Root Mean Squares Error of Prediction*, RMSEP) para se ter uma ideia mais realista da qualidade do modelo (Naes *et al.*, 2004; Zou e Zhao, 2015)

Uma forma de verificar se os modelos apresentam ou não sobre ajuste, é comparar os valores de RMSECV e RMSEC. Se o valor de RMSECV for ligeiramente maior que o valor o valor de RMSEC o modelo não apresenta sobre ajuste, uma vez que no processo de validação cruzada ocorre a remoção dos pontos extremos o que acarreta extrapolação na predição da amostra removida.

Segundo, Naes *et al.* 2004, o sobre ajuste de um modelo depende fortemente do número de amostras usadas, à medida que o número de amostras de calibração aumenta menos significativos são os efeitos de um possível sobre ajuste.

Assim sendo para verificar a adequação do modelo alcançado há que ter atenção a alguns valores/parâmetros estatísticos: o resíduo, que é a diferença entre o valor verdadeiro e o valor ajustado, sendo a soma do quadrado dos erros (SSE, equivalente à SEQ) a soma quadrática destes valores; -a estimação do erro quadrático médio (RMSEE); - o coeficiente de determinação,  $r^2$ , que traduz a percentagem da variabilidade que é explicada pelo modelo; - o coeficiente de correlação,  $R^2$ , que traduz a relação existente entre as duas variáveis em estudo.

Outra forma de complementar a análise, se o modelo PLS obtido é ou não um bom modelo, é uma ferramenta de controlo estatístico que o *software* permite calcular, o Q-residual, que permite verificar a falta de ajuste do modelo caso o valor seja muito abaixo de 1 (Cogdill, Anderson, e Drennen, 2005; Kourti e MacGregor, 1995). O valor deste parâmetro deve estar compreendido entre 0 e 1, sendo 1 o valor ideal na determinação da qualidade da calibração.





---

*III Capítulo*

*Material e Métodos*

---





### III - Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho foram analisadas quatro tipo de amostras, realizando-se análises foliares, análises ao solo, análises ao mosto e por último análises ao vinho.

#### 3.1 - Material vegetal

As castas utilizadas para foram duas, a *Vitis vinífera* cv. Arinto e a *Vitis vinífera* cv. Alvarinho.

##### 3.1.1 - 'Arinto'

Esta casta apresenta-se em quase todo o país. A casta Arinto produz vinhos de elevada acidez, cor citrina e aromas florais e frutados, sendo no Alentejo ideal para lotear vinhos. Para além dessas características confere um caráter ave-ludado, bem estruturado, sendo que os aro-mas remetem para a maçã verde, lima e limão, acompanhados de um toque vegetal. (Curvelo-Garcia & Barros, 2015; Magalhães, 2008; Jose Hidalgo Togores & Fernandez-Cano, 2011)



Figura 26- Casta Arinto com folha característica

Em termos ampelográficos esta casta apresenta: folha adulta de tamanho grande pentagonal, sub-trilobada, perfil irregular com frequente torção do lóbulo mediano para um dos lados. Mediante bolhosa e enrugada. Dentes curvos e convexos. Seio peciolar pouco aberto em V. Folha cotanilhosa e cerdosa na página inferior. Pecíolo claro e mais curto que a nervura principal mediana. Cacho grande, cónico, muito compacto, com várias asas e pedúnculo curto. Bago elíptico-curto, pequeno e verde-amarelado (figura nº 26), película de espessura média e polpa suculenta. (Böhm *et al.*, 2007; Magalhães, 2008)

### 3.1.2 - 'Alvarinho'

A *Vitis vinifera* cv. Alvarinho, preenche a região dos Vinhos Verdes, Muito difundida na zona de Melgaço e Monção, região dos vinhos verdes, é conhecida pelo seu perfil extremamente aromático apresentando um perfil floral de tília, erva-cidreira, madresilva, pêssigo, toranja e maçã. Esta casta produz vinhos estruturados, equilibrados, a sua acidez desperta uma sensação de frescura e teor alcoólico elevado. (Curvelo-Garcia & Barros, 2015; Jose Hidalgo Togores & Fernandez-Cano, 2011)



Figura 27- Casta Alvarinho com folha característica

Em termos ampelográficos, como se pode observar na figura nº 27, esta casta apresenta: Folha adulta pequena, orbicular, geralmente inteira ou com seios laterais pouco marcados, com bordos revolutos e medianamente bolhosa. Dentes curtos e convexos, Seio peciolar aberto com base em V. Cacho pequeno, cónico, alado, frequentemente duplo pelo desenvolvimento da asa, medianamente compacto. (Böhm *et al.*, 2007; Magalhães, 2008; Jose Hidalgo Togores & Fernandez-Cano, 2011) Bago pequeno, arredondado, verde-amarelado, com tons rosados quando exposto ao sol. Película de espessura média. Polpa mole e sumarenta e de sabor característico.

## 3.2 - Análises minerais ao solo

A relação entre nutrientes é bastante importante uma vez que alguns nutrientes disputam pelos mesmos pontos de troca da CTC (capacidade de troca catiónica). Assim, o excesso de um pode levar à deficiência induzida dos outros. Cada espécie vegetal exige uma relação específica entre as bases, de acordo com sua necessidade nutricional.

Devido às diferentes necessidades de nutrientes que dependem de cada variedade, clone, porta-enxerto, capacidade das raízes explorarem o solo e práticas de lavoura do solo, a análise ao solo não deve ser usada como único parâmetro para interpretar o estado nutricional da videira de aí a importância de complementar estas análises com as análises foliares.

Foram retiradas várias porções de solo (durante a dormência da videira) a uma profundidade entre os 0 e os 50 cm para dentro de um recipiente de plástico, sendo necessário 500g de solo para formar uma amostra. Misturou-se muito bem as porções de terra recolhidas e armazenou-se dentro de um saco de plástico até à sua análise.

Os tipos de solos analisados foram: Px, Vx, Sb, A, Vcc, Pv, Ex, Pm, Pgn, Pmn.

Os solos mediterrâneos vermelhos e amarelos de materiais não calcários subdividem-se em oito famílias. Neste trabalho apenas se realizou análise a solos Vcc. Estes são Solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Vermelhos ou Amarelos, de Materiais Calcários, Normais, de calcários cristalinos ou mármore ou rochas cristalofílicas cálcio-siliciosas, estrutura granulosa ou grumosa fina moderada, consistência friável e pH entre os 6,5 e os 7,5. (Cardoso, 1965)

Os litossolos ou solos esqueléticos subdividem-se em onze famílias, neste estudo apenas se recolheu uma, o Ex. A textura destes solos é ligeira ou mediana, dependendo muito da natureza da rocha-mãe e do grau de meteorização atingido. Normalmente existe uma percentagem apreciável de elementos grosseiros. São quase sempre pobres em matéria orgânica. (Cardoso, 1965)

Normalmente, os aluviossolos recebem, periodicamente, adições de sedimentos aluvionares, são solos não hidromórfico sendo constituídos por depósitos estratificados de aluviões. Tem um pH entre 6.5 e 7.5 e em muitos casos, a toalha freática encontra-se a menos de 2 metros de profundidade encontrando-se normalmente humedecidos. Os Aluviossolos e os Solos de baixas são solos Incipientes em que os processos de formação do solo não atuaram ainda por completo para provocar quaisquer diferenciações, apenas se poderá ver uma certa acumulação de matéria orgânica à superfície, apesar de não ser muito grande pois existe sempre um bom arejamento da camada superior ocorrendo assim a uma mineralização mais rápida. Solos A são solos Incipientes - Aluviossolos Modernos, Não Calcários, de textura mediana. (Cardoso, 1965)

Os solos mediterrâneos pardos não calcários subdividem-se em três subgrupos sendo que o Pgn se encontra nos solos mediterrâneos pardos normais. O Pgn é pardo ou castanho; arenoso-franco ou franco-arenoso; estrutura granulosa fina fraca; friável ou muito friável; pH 5,0 a 6,0. O solo Pm corresponde a Solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Para-Barros, de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins proveniente da meteorização de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins, estrutura granulosa muito fina a média granulada consistência friável e Ph entre os 6 - 7,5. (Cardoso, 1965)

O solo Pmn corresponde a Solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de rochas cristalofílicas proveniente da meteorização de rochas cristalofílicas, nomeadamente xistos e gneisses apresenta estrutura granulosa média ou grosseira franca ou consistência muito friável ou solto. (Cardoso, 1965)

O solo Pv corresponde aos solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Vermelhos ou Amarelos, de Materiais Não Calcários, Normais, de rochas cristalofílicas proveniente da meteorização de rochas cristalofílicas frequentemente básicas, muitas vezes com fragmentos da própria rocha com textura granulosa fina a média moderada a forte, consistência friável e pH entre 6 e 7. (Cardoso, 1965)

O solo Px são solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de xistos ou grauvaques, possuem uma cor pardo ou pardo-amarelado, apresentando uma textura franca ou franco-limosa, com uma estrutura granulosa fina moderada a fraca de consistência friável e um pH entre os 5,5 e os 6. (Cardoso, 1965)

Os solos Vx são solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Vermelhos ou Amarelos, de Materiais Não Calcários, Normais, de xistos ou grauvaques com cor pardo-avermelhado ou vermelho. Uma textura franca, franco-limosa o franco-argilo limosa, uma estrutura granulosa fina franca a moderada com consistência friável e pH entre os 5 e o 6.

Os solos Incipientes - Solos de Baixas (Coluviossolos), Não Calcários, de textura mediana dividem-se em seis famílias, no estudo apenas foi recolhido o Sb de textura mediana não calcário e todas as famílias apresentam ser pedregosas, mal drenadas e inundáveis.

Foi necessário registar eventuais sintomatologias de carência verificadas na videira. Após a colheita, as folhas foram lavadas com água destilada e posteriormente secas.

As amostras de solo foram analisadas no laboratório "*Labs & Technological Services AGQ S. L.*" onde a extração ocorreu pelo método do acetato de amónio para análise de potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e a leitura destes minerais foram efetuadas por espectrometria de absorção atómica. Recorreu-se à extração dos elementos trocáveis através de uma solução de acetato de amónio pH 7,0 e determinação dos seus teores no extrato.

### *3.3 - Análises minerais às folhas*

Recolheu-se cerca de 60 folhas (duas em cada videira) durante o período da floração. As folhas escolhidas encontravam-se em zona oposta ao cacho basal do pâmpano, de um talão central da cepa. Foram colhidas folhas em estado normal, sem sintomatologia de doenças ou pragas, assinalando-se ainda a casta e porta-enxerto, já que as exigências das castas e a capacidade de absorção para os nutrientes dos porta-enxertos são distintos.

Ao se analisar as folhas consegue-se estudar as atividades fisiológicas dentro da planta. Assim sendo a nutrição mineral irá refletir-se nas folhas, pelo que se pode considerar a análise foliar como critério de diagnóstico que assenta na relação entre o suprimento de nutrientes e os níveis dos elementos, e que aumentos ou decréscimos nas concentrações se relacionam com produções mais altas ou mais baixas. O teor do elemento mineral analisado dentro da já se encontra afetado pelos diversos fatores que existem no exterior e interior da planta para afetá-lo.

Tabela 10 - Valores de referência para análise foliar segundo o laboratório AGQ - Labs Technological Services

<b>Elemento</b>	<b>Baixo (%)</b>	<b>Alto (%)</b>
<i>Potássio</i>	1,01	1.40
<i>Cálcio</i>	2.41	3.50
<i>Magnésio</i>	0.26	0.30
<i>Azoto</i>	2.45	2.85

As amostras de solo foram analisadas no laboratório “*Labs & Technological Services AGQ S. L.*” através do método ICP-OES (espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente). A determinação de azoto foi através do método de Dumas. Resumidamente foram pesadas 0,12 g de folha seca para dentro de um cadinho de estanho e utilizou-se um auto-analisador de azoto da marca Leco® (*LECO Corporation., St. Joseph, MI, EUA*) modelo FP-2000 *nitrogen analyser, Leco Instruments, Inc. St.*, aparelho que tem como base de funcionamento o método de Duma, onde as amostras foram decompostas a cerca de 950°C na presença de oxigénio puro, ocorrendo a completa da fração azotada em azoto elementar (N), que depois de arrastada pelo gás de hélio foi depois determinado por condutividade térmica. É importante salientar que antes de qualquer análise se realiza sempre a calibração do aparelho com EDTA.

### 3.4 - Uva

As amostras de uvas foram recolhidas no campo um dia antes da vindima de cada parcela escolhida previamente tendo em conta os valores que as parcelas apresentaram na análise foliares onde se escolheu parcelas que tinham demonstrado altos e baixos valores de cálcio. Após o seu esmagamento procedeu-se à sua leitura no equipamento de infravermelho próximo e em seguida à sua transformação em cinzas, tendo-se produzido sempre três réplicas de cada amostra. As amostras foram guardadas à temperatura ambiente até à sua leitura no espectrómetro de absorção atómica.

Foram analisados 60 amostras de mosto diferentes, mas apenas 10 correspondiam ao vinho analisado. Pelo que apenas foi possível estudar a origem de 10 vinhos.

### 3.5 - Vinho

Os vinhos utilizados foram originários da região Alentejo, sub-região DO Borba. As amostras de vinho foram recolhidas na Adega Cooperativa de Borba e procedeu-se à sua leitura no equipamento de infravermelho, FTIR e NIR. Em seguida procedeu-se as análises de caracterização do vinho e só posteriormente se realizou a sua transformação em cinzas, tendo-se produzido sempre três réplicas de cada amostra. As amostras foram guardadas à temperatura ambiente até à sua leitura no espectrómetro de absorção atómica.

Foram analisadas 79 amostras de vinho base branco produzido através das castas anteriormente descritas.

### 3.5.1 - Caracterização do vinho

O vinho foi caracterizado tendo em conta os seguintes parâmetros: massa volúmica (g/mL); TAV (% vol.); acidez volátil (g ácido acético/L); acidez total (g ácido tartárico/L); pH e açúcares redutores.

#### 3.5.1.1 - Massa volúmica

A massa volúmica ou densidade de um vinho ou de um mosto, é o quociente entre a massa de um certo volume de vinho, ou de mosto a 20 °C, e esse volume. Esta medida expressa-se em grama por mililitro (g/mL) ((*Regulamento (CEE) N.º 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro, 1990*). A densidade e Temperatura (°C) foram medidas através do *Mettler Toledo 30Px* e o resultado final foi arredondado à unidade.

Esta análise foi de encontro com o método *OIV-MA-AS2-01A - Density and Specific Gravity at 20°C*.

#### 3.5.1.2 - Título alcoométrico volúmico

O título alcoométrico volúmico exprime a existência de álcool etílico no vinho (Delanoe, Maillard, & Maidondieu, 1997) e é igual ao número de litros de etanol contidos em 100 litros de vinho, sendo ambos os volumes medidos à temperatura de 20 °C. O seu símbolo no rótulo é “% vol.”. A determinação do título alcoométrico inicia-se com a evaporação do álcool por destilação. Após a obtenção do destilado, mede-se a sua massa volúmica ou o seu TAV por densimetria. Conhecida a temperatura, existem tabelas que permitem estabelecer a correspondência entre uma massa volúmica e o título alcoométrico. A densidade e Temperatura (°C) foram medidas através do *Densito 30PX Meter (Mettler-Toledo, Switzerland)* e o resultado final foi arredondado à unidade.

Parâmetro analisado segundo o método *OIV-MA-AS312-01A - Alcoholic strength by volume*.

#### 3.5.1.3 - Acidez Total

A acidez total corresponde aos ácidos orgânicos não ionizados presentes no vinho, corresponde à acidez volátil e à acidez fixa. Os ácidos orgânicos mais importantes são o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico, não tem em conta a contribuição dos ácidos carbónicos e ácido sulfuroso. O seu teor total varia entre 4 e 9 g/L expresso em ácido tartárico.

A acidez total foi calculada através de um titulação ácido-base, que consiste numa neutralização dos ácidos (de uma amostra de 10mL) através de uma solução alcalina de NaOH a 0,1M onde se utiliza como indicador o azul de bromotimol, após a obtenção do volume utilizado de base multiplica-se esse valor por 0,75 obtendo-se assim o resultado final que foi expresso em g/L de ácido tartárico.

Esta análise foi realizada tendo em conta o método *OIV-MA-AS313-01 - Total acidity*.

#### 3.5.1.4 - Acidez Volátil

A acidez volátil corresponde à fração dos ácidos orgânicos, constituída essencialmente pelos ácidos gordos da série acética, tanto no estado livre como no estado salificado, onde o ácido acético representa cerca de 90% do total. Nos vinhos brancos a quantidade de ácido acético não deve exceder os 0,88 g/L, sendo o limite máximo legal de 1,2 g/L em ácido acético (OIV, 2015).

A acidez volátil foi expressa em g/L de ácido acético e foi determinada neste estudo através do *WineScan FT 120* tecnologia FTIR (*Foss Electric, Denmark*).

#### 3.5.1.5 - pH

Relativamente ao pH este depende da natureza dos ácidos, das suas concentrações e da proporção em que se encontram saturados por bases, o vinho é uma bebida ácida, com um pH que oscila entre 2,8 e 3,8. Baixos valores de pH garantem estabilidade ao vinho (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

Para a medição do pH efetuou-se a medida da diferença de potencial entre dois elétrodos dentro da amostra. Antes de qualquer leitura o aparelho foi calibrado com a solução tampão de pH 7 e posteriormente com uma solução padrão de pH 4 ambos a 20 °C. O pH foi calculado através do *Combom H198130* (*Hanna Instruments, Austrália*) e arredondado às décimas.

Este parâmetro foi avaliado tendo em conta o método *OIV-MA-AS313-15 - pH*.

#### 3.5.1.6 - Açúcares redutores

Os açúcares redutores correspondem à maioria dos açúcares solúveis do vinho. A glicose e frutose, hexoses, existem em grandes quantidades no mosto contudo durante a fermentação estes diminuem drasticamente (açúcares fermentescíveis). A arabinose e a xilose, pentoses, não são fermentáveis e em conjunto com vestígios de açúcares fermentescíveis são os chamados açúcares residuais.

Os açúcares redutores são expressos em g/L e foram determinados neste estudo através do WineScan FT 120 tecnologia FTIR (*Foss Electric, Denmark*).

### 3.5.1.7 - Turbidez

A turbidez deve-se à presença de partículas em suspensão no vinho. Este parâmetro mede a turvação provocada pela difusão da luz em contato com as partículas do vinho. Neste estudo a turbidez foi lida três vezes e utilizou-se um *TB 300 IR (TurbiDirect, Loviband®, Germany)* e os resultados expressos em UNT e arredondados às décimas. Antes de qualquer leitura o aparelho foi calibrado com as soluções padrão <0,1 NTU, 20 NTU, 200 NTU e 800 NTU.

A análise teve em conta o método OIV-MA-AS2-08 - Wine turbidity

Tabela 11- Valores de turbidez aceitáveis. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a)

Vinho	UNT	
	Brilhante	Turvo
<b>Branco</b>	< 1,1 NTU	> 4,4 NTU
<b>Rosé</b>	< 1,4 NTU	> 5,8 NTU
<b>Tinto</b>	< 2,0 NTU	> 8,0 NTU

### 3.6 - Determinação de minerais (Cálcio, Potássio e Magnésio) nas uvas e vinho

Para a determinação do teor de minerais por EAA foram realizados dois procedimentos, um com a leitura direta do vinho (após diluições 1:50) e outro onde se recorreu a um pré-tratamento da amostra.

O pré-tratamento da amostra foi a transformação do vinho em cinzas. Para a obtenção das cinzas todo o material utilizado foi submetido a um processo de descontaminação, com ácido nítrico diluído (20 %) durante 18 horas sendo de seguida lavado com água de qualidade tipo I (resistividade elétrica de 18 MΩ.cm).

A água utilizada na preparação das soluções era ultrapura, de qualidade tipo I e todos os reagentes usados durante a análise eram de qualidade *suprapur* ou equivalente.

As cinzas correspondem à matéria mineral do vinho. O teor de cinzas foi determinado após um banho-maria a 100 °C durante 50 minutos até completa evaporação da água e álcool e de seguida sofreu uma pré-inceneração a 200 °C até a amostra carbonizar. Só depois da amostra carbonizada é que a mesma entrou em uma mufla a 500 °C até só se verificar cinzas. O conteúdo em cinzas foi expresso em g/L (ver equação nº 7)

Equação 6- Determinação do teor em cinza

$$\text{Cinzas} = \frac{(\text{Peso do cadinho com cinza} - \text{Peso do cadinho vazio})}{\text{Volume da amostra}}$$

Esta análise foi baseada no método *OIV-MA-AS2-04 - Ash*.

Após a obtenção das cinzas e de estas terem sido pesadas, procedeu-se a uma digestão ácida. Adicionou-se 3 mL de ácido clorídrico 0,5 M (*EMSURE*<sup>®</sup>, p.a. 37%) para dentro do cadinho com as amostras em cinza e verteu-se a solução para um tubo de digestão. Posteriormente adicionou-se mais 3 mL de ácido clorídrico a 0,5 M (*EMSURE*<sup>®</sup>, p.a. 37%) para se proceder a lavagem do cadinho e juntou-se ao tubo de digestão. Colocou-se os tubos de digestão em um banho seco, *Thermostat dry-blocks (Selecta, Barcelona, Spain)*, à temperatura de 140 °C. Quando a solução ficou translúcida retirou-se o tubo de digestão do banho seco e com a ajuda de um funil e um filtro *Whatman* nº 542 verteu-se a digestão ácida para um balão de 50 mL. Após essa etapa perfez-se o balão com água ultrapura.

Antes do início qualquer leitura das amostras ou até mesmo de se fazer a curva de calibração foi necessário estabelecer as condições instrumentais a adotar para cada elemento a analisar, as características obtidas após otimização do método encontram-se nas tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12- Características instrumentais utilizadas para a leitura do Cálcio

Gama de leitura (mg/L)	1 - 200
Corrente da lâmpada (mA)	10 mA
Comprimento de onda (nm)	422,7
<i>Slit width</i> (nm)	0,5
<i>Measurement mode</i>	<i>Peak area</i>
<i>Calibration Mode</i>	<i>Linear least squares</i>
<i>Fuel flow</i> (L/min)	2
<i>Air flow</i> (L/min)	13,5
<i>Workhead height</i> (mm)	0,2

Tabela 13 - Características instrumentais utilizadas para a leitura do Potássio

Gama de leitura (mg/L)	0,8 - 40
Corrente da lâmpada (mA)	8 mA
Comprimento de onda (nm)	766,5
<i>Slit width</i> (nm)	1
<i>Measurement mode</i>	Peak area
<i>Calibration Mode</i>	Linear least squares
<i>Fuel flow</i> (L/min)	2
<i>Air flow</i> (L/min)	13
<i>Workhead height</i> (mm)	0,1

Tabela 14- Características instrumentais utilizadas para a leitura do Magnésio

Gama de leitura (mg/L)	1 - 40
Corrente da lâmpada (mA)	10 mA
Comprimento de onda (nm)	285,2
<i>Slit width</i> (nm)	0,5
<i>Measurement mode</i>	<i>Peak area</i>
<i>Calibration Mode</i>	<i>Linear least squares</i>
<i>Fuel flow</i> (L/min)	2
<i>Air flow</i> (L/min)	13,5
<i>Workhead height</i> (mm)	0,2

Os fluxos e o *workhead height* foram definidos durante a fase de otimização do método.

Para se proceder à análise no espectrómetro de absorção atômica (*Avanta PM, GBC, USA*) foi necessário preparar os padrões para construir a reta de calibração. (ver tabela nº 17) Para o cálcio utilizou-se o padrão *Calcium standard solution* da *Merck* de 1000 ppm, para o potássio utilizou-se o padrão *Potassium Standard Solution* da *Chem Lab* de 1000 ppm e para o magnésio utilizou-se o padrão *Magnesium Standard Solution* da *Chem Lab* de 1000 ppm. Nas soluções padrões referentes ao cálcio e magnésio foi adicionado em cada solução 1 mL de a solução de Lantânio 5% (m/v), enquanto que para as soluções de potássio se adicionou 2 gotas de ácido nítrico.

Tabela 15- Padrões de calibração utilizados para a análise dos minerais

<i>Cálcio (mg/mL)</i>	<i>Potássio (mg/mL)</i>	<i>Magnésio (mg/mL)</i>
0,48	0.22	0,16
10	4	2
50	8	3
100	20	5
200	40	10
		20
		40

Após se ter obtido a curva de calibração, antes de se iniciar a leitura das amostras três padrões foram escolhidos, a concentração mais baixa, a concentração do meio e a última concentração da curva de calibração para se confirmar que o aparelho estava a ler correctamente, ou seja para validar a curva de calibração.

Para a leitura dos iões cálcio e magnésio adicionou-se 1 mL de a solução de Lantânio 5% (m/v), enquanto que para a leitura do potássio foi adicionado duas gotas de ácido nítrico.

Através do *software* disponível no equipamento e selecionado o método *Root Mean Squase (RMS)* foi calculado a concentração dos diferentes minerais.

Para a determinação dos limites de deteção e de quantificação realizou-se 35 ensaios com branco. Relativamente à percentagem de recuperação o critério de aceitação foi de 95-105 %.

O método realizado teve em conta a metodologia da O.I.V. para a validação dos métodos analíticos OIV-MA-AS1-12: R2005.

Para as diferentes análises utilizou-se balança, modelo A 210P (*Sartorius analytic, USA*), estufa modelo universal 40 (*Memmert, Schwabach, Germany*), água destilada (*Millipore, Tank 30 litre, Guyancourt, France*), e água ultra-pura (*Millipore, Direc-Q® 5UV, Guyancourt, France*).

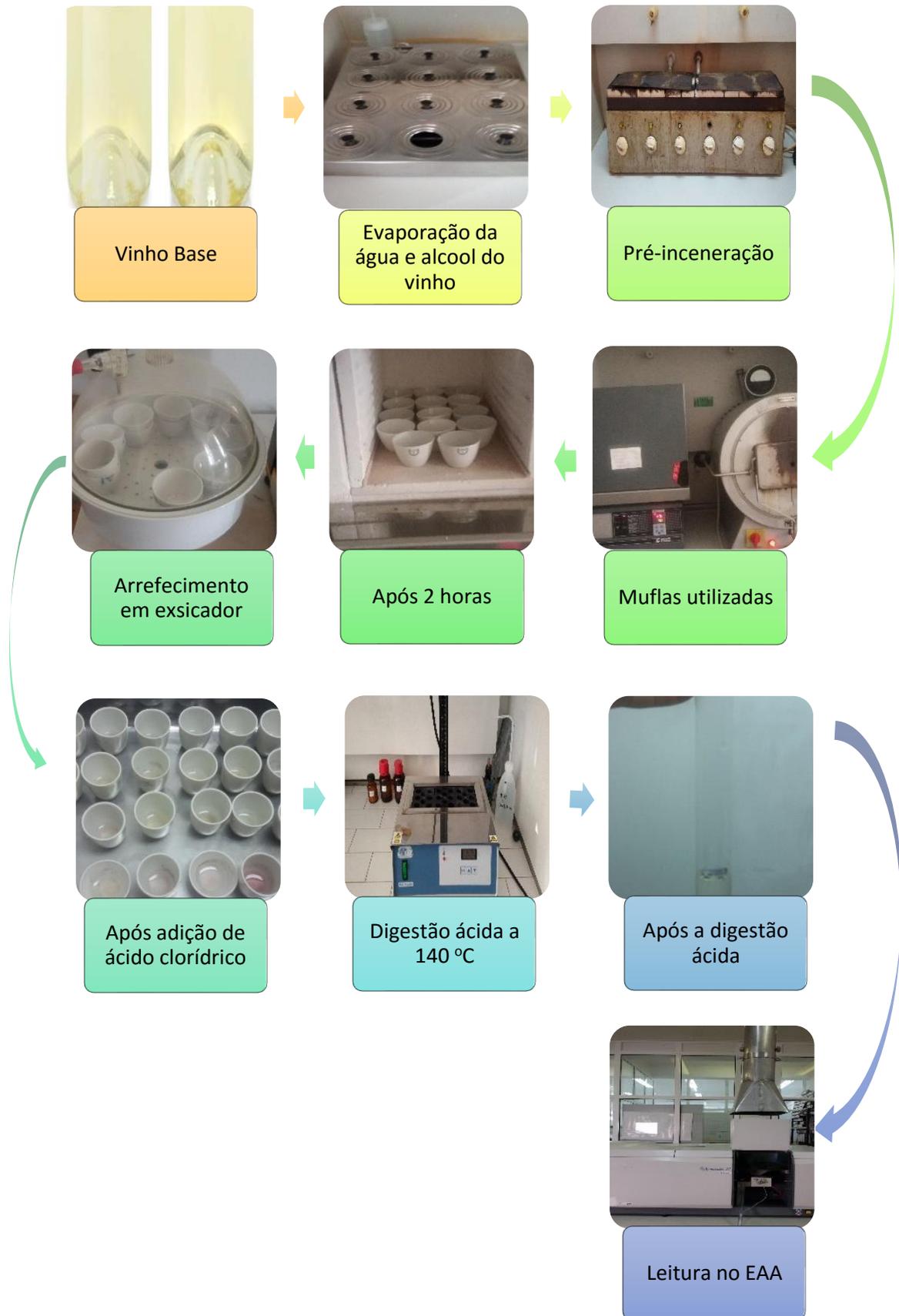


Figura 28 – Passos realizados durante a determinação dos minerais potássio, cálcio e magnésio

### 3.5.8 - Determinação de azoto e proteína total mosto e vinho

A fração de azoto coagulável é composta basicamente por proteínas de alto peso molecular, albumina e globulina (Yúfera, 1998). Contudo apesar de estes representarem uma pequena parte do azoto total do mosto/vinho a sua determinação atua como parâmetro na avaliação do teor de azoto de alto peso molecular e consequentemente na qualidade do vinho espumante ao nível da sua estabilidade físico-química e ao nível da espuma produzida no copo (Batista *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2002; Pozo-Bayón *et al.*, 2009). O método *Kjeldahl* determina o azoto orgânico podendo o processo dividir-se em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Contudo antes de se optar por o método *Kjeldahl* tentou-se recorrer ao método de Dumas. O método de Dumas é um método gasométrico que envolve a combustão completa da amostra, a uma temperatura de 750 – 950 °C, resultando a formação de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, sendo este último quantificado volumetricamente após separação do dióxido de carbono, visto que ocorre uma conversão completa da fração azotada em azoto elementar (N) (Matejovic, 1993). Devido a algumas modificações introduzidas ao procedimento original do método no sentido de reduzir o tempo de combustão e tentar eliminar algumas interferências, como o aumento da temperatura, este método em determinadas matrizes apresenta ser um bom substituto do método de referência, o método *Kjeldahl*. Porém neste caso o método não resultou com a análise do mosto nem com a análise do vinho.

Para a análise do azoto total, pelo método *Kjeldahl*, foram medidas 25 mL da amostra de vinho e para o mosto 20 mL para dentro de um tubo de *Kjeldahl*. A digestão das amostras ocorreu no *Kjeldatherm System KB20* (Gerhardt Laboratory Instruments, Bonn, Germany). Para o tubo de digestão mediu-se 20 mL de ácido sulfúrico (Merck, Empure ISO for analysis, 95-96%) concentrado juntamente com uma pastilha catalisadora (1:1 sulfato de cobre: sulfato de potássio, *Thompson and Capper, Ltd, UK*) e colocaram-se os tubos em um bloco de digestão onde a temperatura foi subindo através de intervalos previamente otimizados (ver tabela nº 13) até que a solução ficasse clara (cerca de 4 horas para o vinho e 5 horas para o mosto).

Tabela 16- Rampa de temperatura utilizada para digerir o mosto

<i>Tempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
50	120
150	240
250	480

Tabela 17- Rampa de temperatura utilizada para digerir o vinho base

<i>Tempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
20	80
45	100
60	120
80	150
120	200
150	280
180	380
210	450

Após a digestão, os tubos foram retirados e arrefecidos à temperatura ambiente, e posteriormente adicionou-se 30 mL de água ultra-pura. As amostras encaminhadas para o destilador automático *Kjeltec Auto-analyzer*, modelo 1030 (*Tecator, Höganäs, Sweden*) onde foram alcalinizadas com 20 ml de NaOH 40% (*Eka pellets purum p.a. 98%*), e destiladas sobre uma solução alcoólica de ácido bórico (*Fluka Assay, purum p.a., 99%*) e indicador (vermelho de metilo (*Merck, indicator ACS, pH 4,4-6,2*) e verde de metilo (*Merck, indicator ACS, pH 3,8-5,4*)) que posteriormente foi titulado com ácido clorídrico a 0,1 M (*Fixanal, Riedel-deHaën, 3.646 g HCl*). Em cada bloco digestor analisaram-se sempre dois brancos e amostras em duplicado.

A quantidade de amostra a ser usada depende do teor de azoto da amostra. Porém deve ser suficiente para gerar menos equivalentes de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do que o existente no ácido bórico.

*Equação 7- Percentagem de azoto orgânico*

$$\text{Azoto \%} = \frac{V_{HCl} \times 1,4 \times [HCl]}{M}$$

Onde V HCl é o volume gasto na titulação e M é a massa da amostra.

Para a determinação do teor de proteína multiplicou-se o teor de azoto pelo fator 6.25. Este fator refere-se a uma estimativa para percentagem de azoto (cerca de 16%) que estará presente na maioria das proteínas do vinho.

Esta análise foi realizada tendo por base o método *OIV-MA-AS323-02B - Total nitrogen*.

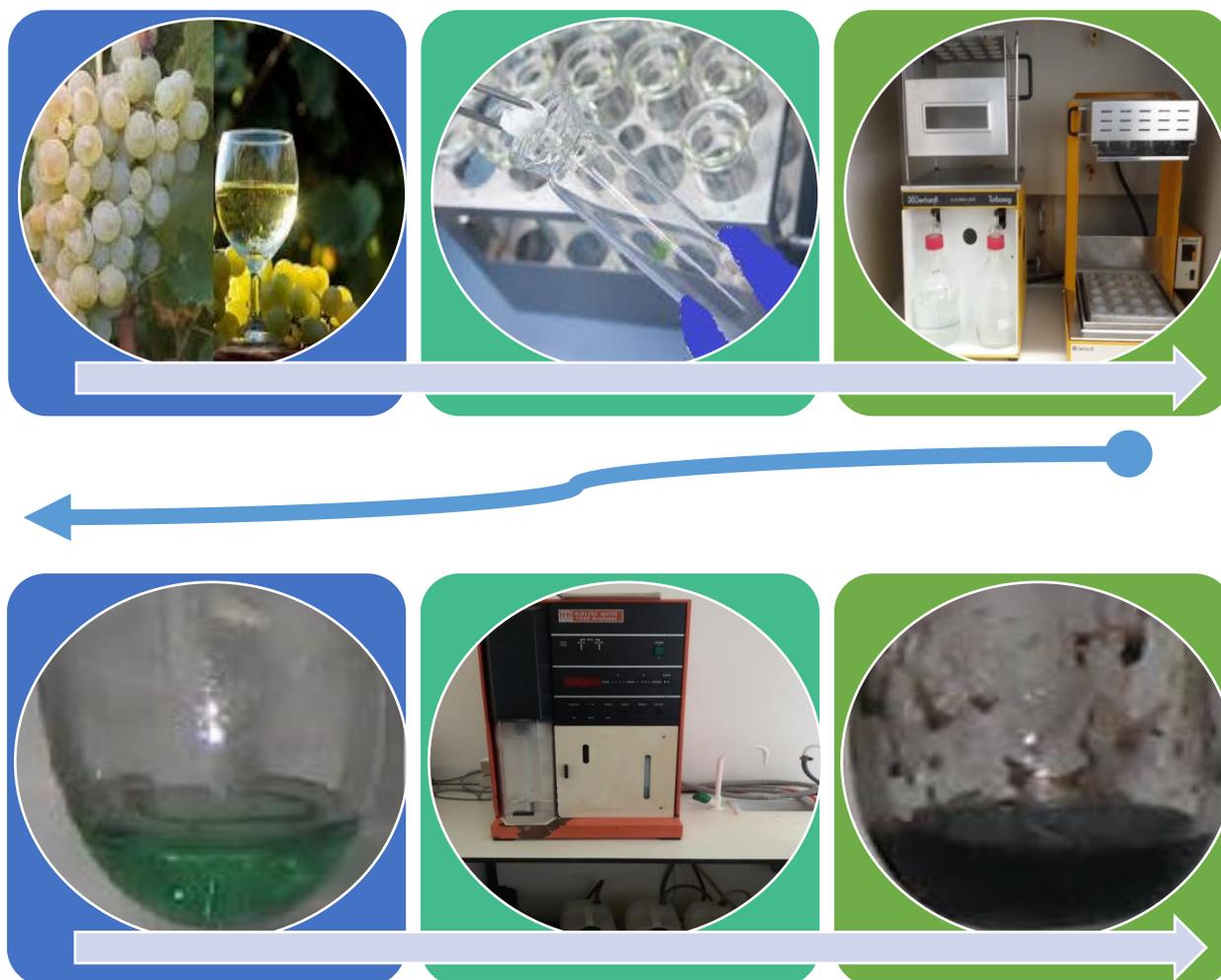


Figura 29 – Esquema sobre a determinação do azoto e proteína no mosto e vinho base

### 3.7 - Obtenção de espectros de infravermelho próximo

Os espectros NIR das 78 amostras de vinho base e 60 amostra de mosto foram obtidas, em triplicado, no espectrofotômetro *Luminar 5030* (*Brimrose Corp, MD, USA*) com o acessório para a leitura de líquidos (*Transfectane, 1410-SP-13993*), dentro do intervalo de comprimento de onda de 1100 – 2300 nm. Utilizou-se uma resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$  e numa leitura fez-se 250 varrimentos e utilizou-se uma abertura de 4 vezes a intensidade do sinal.

### 3.8 - Tratamento Quimiométrico dos Dados

Os espectros obtidos foram importados e tratados utilizando a ferramenta quimiométrica PLS (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais), através do *software Unscrambler®*, versão 10.3 (CAMO Software A/S, Oslo, Norway) para a obtenção do modelo de calibração e para o tratamento estatístico.

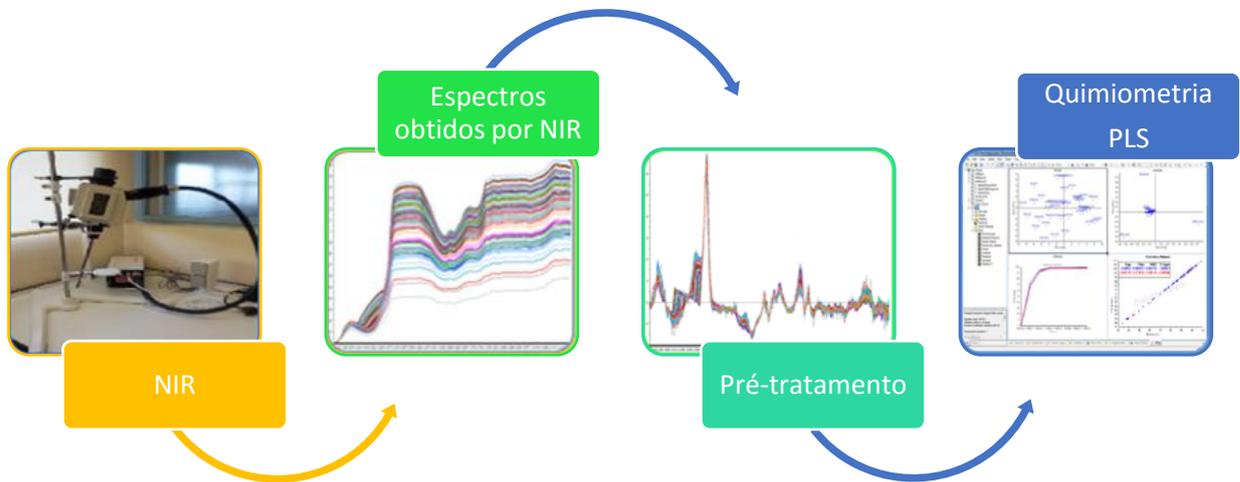


Figura 30 – Tratamento quimiométrico a espectros obtido por espectrómetro de infravermelho próximo





---

*IV Capítulo*

*Resultados e Discussão*

---





## *IV - Resultados e Discussão*

### *4.1 - Análise ao solo e foliar*

Para quantificar o teor de azoto e proteína os métodos químicos mais usados são o método *Kjeldahl* ou o método Dumas (Moore *et al.*, 2010). Neste estudo a análise foliar foi realizada pelo método de Dumas em deterioramento do método *Kjeldahl* pelo facto de o primeiro método ser mais rápido (o método Kjeldahl demorou cerca de 5 horas enquanto que o método Dumas através do equipamento Leco demorou 7 minutos) e por utilizar menos reagentes (o método Dumas apenas utilizou dois gases: oxigénio e hélio) tornando-se assim mais económico e amigo do ambiente. Contudo ambos os métodos requerem equipamento dispendioso.

Das análises de solo e foliares efetuadas observou-se, como seria espectável, que o maior teor de nutriente nas folhas está diretamente correlacionado com um maior nível desse nutriente no solo. Das diversas correlações que se efetuaram com os diferentes minerais analisados, apenas se apresentam aquelas em que está presente algum nível de antagonismo iónico, à exceção do azoto e do potássio que apresentaram uma correlação positiva. É de salientar que as correlações foram obtidas com base no teor de minerais dos diferentes tipos de solos estudados (Px, Vx, Sb, A, Vcc, Pv, Ex, Pm, Pgn, Pmn) onde se encontravam a *Vitis vinifera* cv. Arinto e a *Vitis vinifera* cv. Alvarinho tendo apenas em conta as plantas que continham o mesmo porta-enxerto o 1103 Paulsen. As correlações obtidas derivaram da análise de 103 amostras.

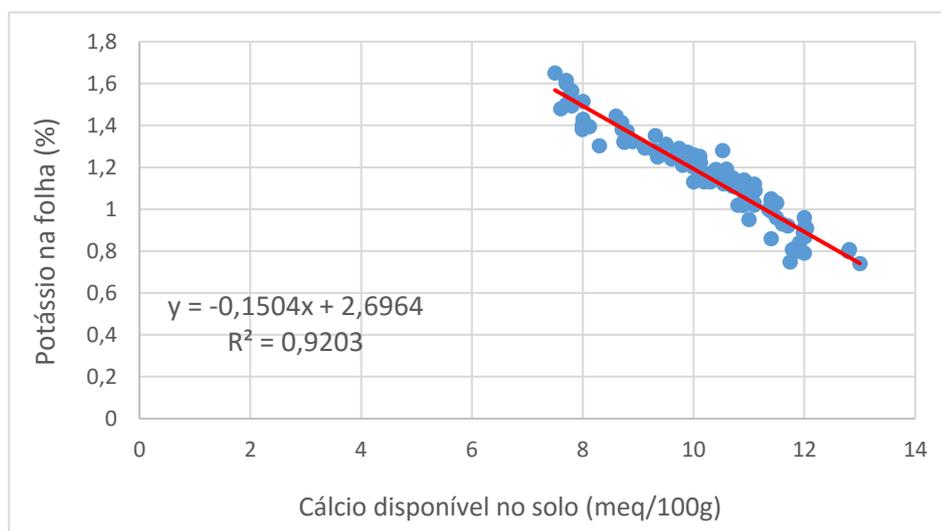


Figura 31 - Correlação entre o cálcio do solo e o potássio na folha

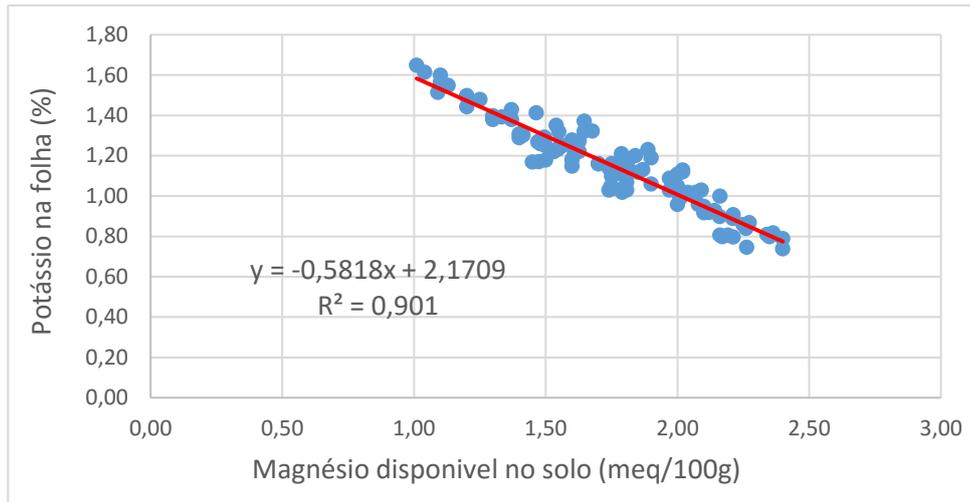


Figura 32 - Correlação do magnésio disponível no solo com o potássio

Através das figuras 31 e 32 verificou-se que os altos teores de cálcio e magnésio no solo podem ter alguma influência na diminuição da absorção de potássio pelas plantas, ou seja observou-se um possível antagonismo destes elementos através das correlações obtidas entre os teores de cálcio, magnésio e potássio, onde se obteve um declive negativo. Tendo em conta a capacidade de troca catiônica radicular um excesso de cálcio no solo poderá levar a uma diminuição da absorção de potássio nas dicotiledóneas (Quelhas dos Santos, 1996). A disponibilidade de potássio no solo e a sua absorção pelas plantas parece estar relacionada com a disponibilidade dos catiões divalentes cálcio e magnésio (Oliveira, Carmello e Mascarenhas, 2001).

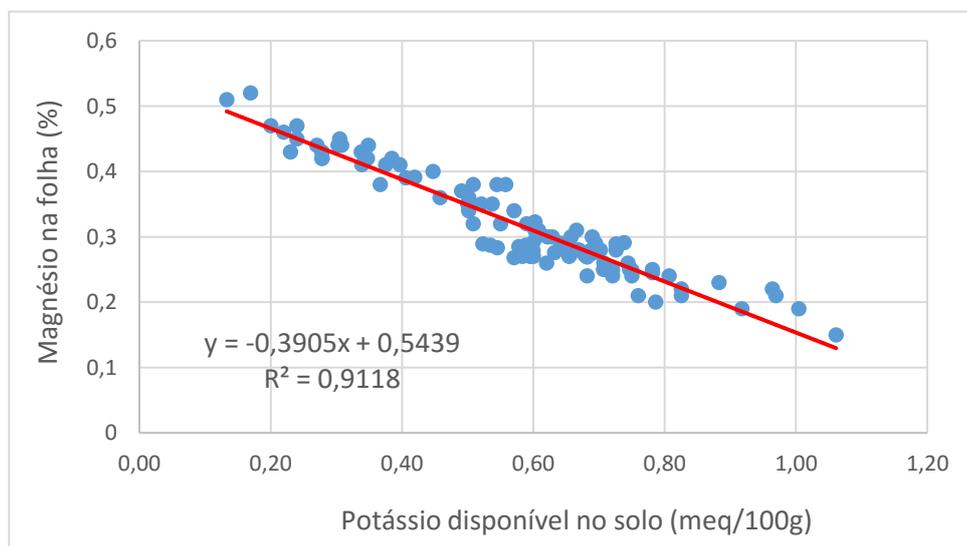


Figura 33 – Relação entre o potássio do solo e o Magnésio nas folhas

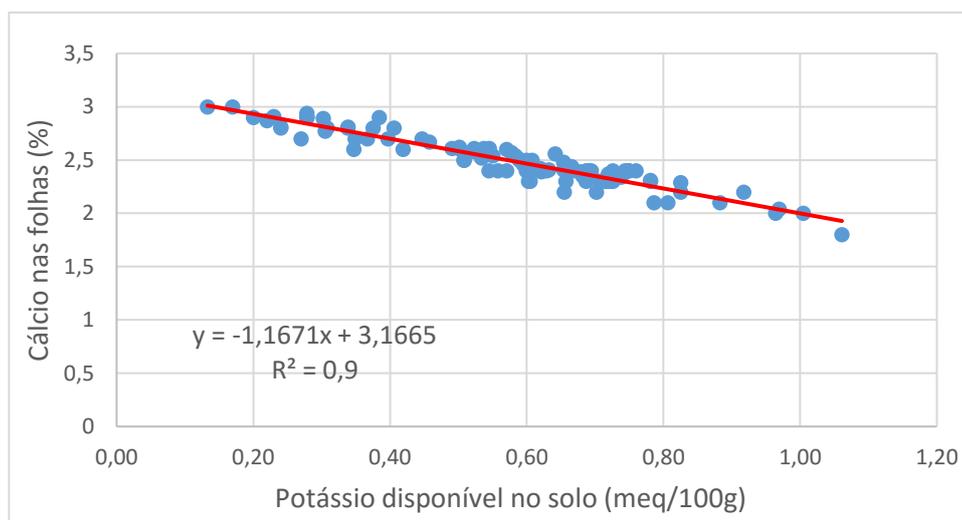


Figura 34 – Relação entre o potássio do solo e o cálcio nas folhas

Observou-se através das figuras 33 e 34 que os teores de potássio no solo também se correlacionaram negativamente com os teores de cálcio e magnésio nas folhas. Pelo que quanto maior o teor de potássio no solo menor a absorção desses elementos tal como verificaram Araujo, 2008; Fonseca e Meurer, 1997; Iba, 2009; Li *et al.*, 2013. Isto pode acontecer devido ao efeito de diluição visto que o potássio potencia o crescimento da planta, uma planta bem nutrida em potássio cresce mais. O potássio ao atravessar mais depressa a membrana plasmática pode deprimir a absorção dos catiões divalentes como o cálcio e o magnésio que são mais lentos a atravessar a membrana plasmática (Marschner, 1995). Outra possível explicação poderá ser a absorção preferencial de potássio pelas plantas devido ao facto deste ião monovalente apresentar um menor grau de hidratação (raio iónico do potássio quando hidratado é de 3,31 Å quando comparado com os catiões divalentes (o raio iónico do magnésio quando hidratado é de 4,28 Å e do cálcio é de 4,13 Å (Marschner, 1995; Nightingale, 1959). A maior diferença de absorção verifica-se entre o magnésio e o potássio o que poderá ser explicado pelo tamanho do raio iónico hidratado (este é maior no magnésio do que no potássio e assim entrar mais facilmente o potássio depois o cálcio e só por fim o magnésio) bem como o potencial eletroquímico nos locais de absorção (Fonseca e Meurer, 1997). Quanto maior a carga, maior será a força de atração entre os catiões divalentes e as partículas do solo (argilas/coloides) devido às forças eletrostática, isto porque a força de atração entre as cargas opostas (negativas e positivas) é inversamente proporcional ao quadrado da distância entre as cargas, contudo dever-se-á ter sempre em atenção que os iões na solução do solo se encontram hidratados e é assim que são absorvidos pela planta pelo que se deve ter em conta o raio iónico hidratado.

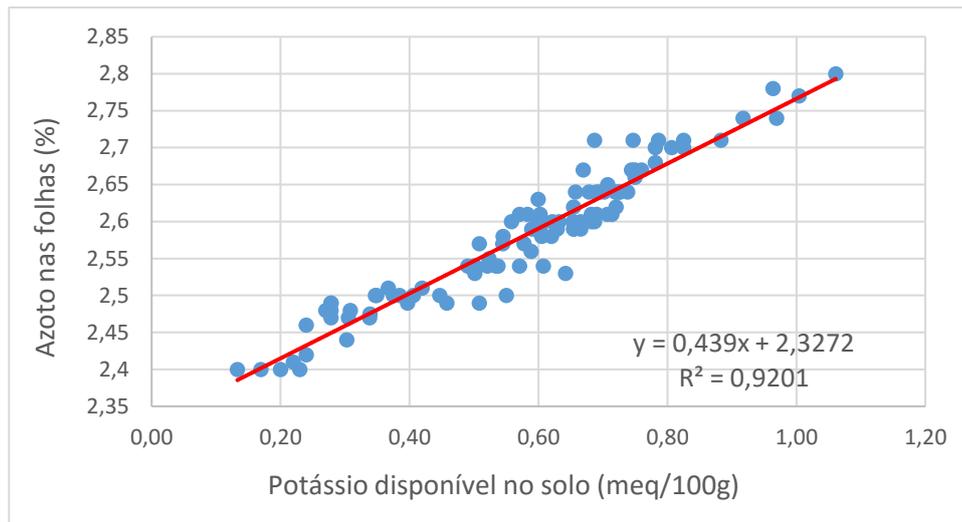


Figura 35 – Relação entre o potássio do solo e o Azoto nas folhas

Verificou-se também que quanto maior a concentração de potássio no solo maior será a concentração de azoto na folha tal como foi verificado por Helal e Mengel, 1979; Hu *et al.*, 2016; Mengel, Viro e Hehl, 1976; Ruiz e Romero, 2002. Num estudo realizado por Xu, Wolf e Kafkafi (2002) na pimenta doce, os autores observaram que a absorção do azoto parece ser limitada quando se observa baixos teores de potássio. O potássio ao ser transportado em conjunto com o azoto no xilema irá afetar a distribuição de azoto da raiz para toda a planta (Ruiz e Romero, 2002) o que justifica o maior crescimento das plantas associado ao maior teor de potássio no solo. O azoto é aplicado em quantidade suficiente para haver aumento da produção, contudo esta passa a ser limitada se existirem baixos teores de potássio. Assim, as maiores doses de azoto somente promoverão uma maior produção se acompanhadas de uma boa concentração de potássio, pelo que se pode considerar a existência de uma forte interação entre estes dois nutrientes no crescimento da cultura (Brar *et al.*, 2011). Tal pode dever-se ao facto de o metabolismo do azoto nas plantas requerer quantidades adequadas de potássio no citoplasma (Leigh e Wyn Jones, 1984; Xu, Wolf e Kafkafi, 2002), para além disso estudos realizados por Daliparthy, Barker e Mondal (1994) observaram que não existia competição de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  durante a sua absorção pela planta. Contudo nem todos os estudos realizados até ao momento são consensuais no que toca a interação entre o potássio e o azoto.

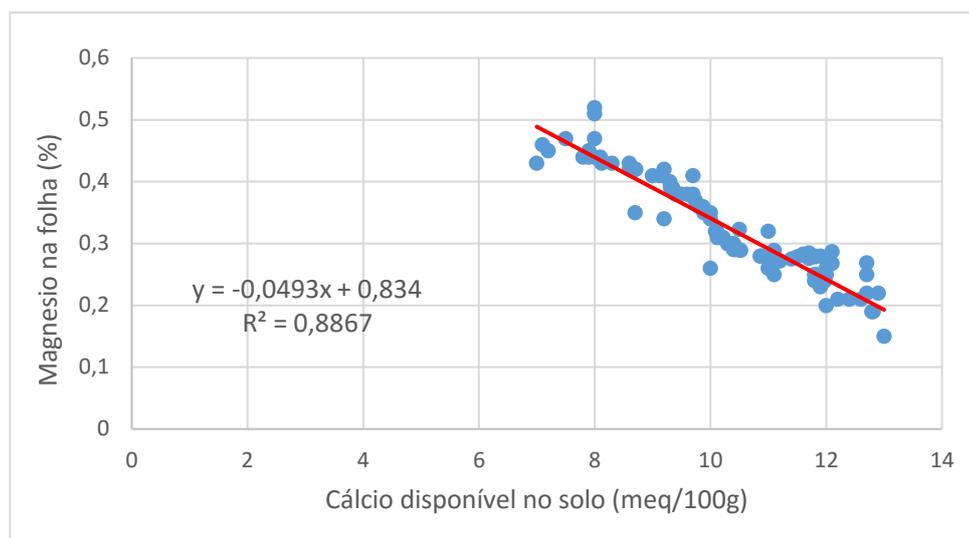


Figura 36 - Relação entre o cálcio do solo com o magnésio das folhas

Observou-se que os altos teores de cálcio no solo reduzem a absorção de magnésio (Marschner, 1995; Moore, Overstreet e Jacobson, 1961; Moreira, Carvalho e Evangelista, 1999), uma vez que os seus teores nas folhas diminuem com o aumento de cálcio no solo (figura nº 36). Isto pode dever-se ao facto das suas propriedades químicas serem similares, uma vez que têm o mesmo grau de valência, grau de hidratação e mobilidade similar, fazendo com que haja competição pelos sítios de adsorção no solo e na absorção pelas raízes (Moore *et al.*, 1961). Como consequência, a presença excessiva de um pode prejudicar os processos de adsorção e absorção do outro, nesta região o cálcio poderá encontrar-se em maior concentração devido à tipologia de solo (como por exemplo os solos mediterrâneos vermelhos e amarelos de materiais calcários) e devido à água utilizada para a rega (o cálcio é um elemento dominante nesta zona devido aos carbonatos  $\text{CaCO}_3$  e bicarbonatos  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$  que irá competir com a ligação do magnésio com os coloides e o magnésio ficará livre e poderá sofrer mais facilmente perda por lixiviação não ficando disponível para ser absorvido pela planta.

## 4.2 - Caracterização do mosto e vinho base

Através das análises físico-químicas realizadas para o controlo do processo e do produto pode-se garantir a qualidade necessária para elaboração dos vinhos. O *Decreto-Lei nº 35846/46, de 2 de Setembro* 1946 faz referência às características do vinho espumante no artigo 17º.

A densidade ou massa volúmica varia em função do extrato seco, grau alcoólico e o teor em açúcares. Em vinhos secos o seu valor anda muito próximo do valor da água, o que se pode confirmar pelos valores obtidos, o vinho apresenta um valor médio de massa volúmica de  $0,9908 \pm 0,0007$  g/mL pelo que nos parece ser já indicativo de se estar presente perante um vinho seco.

Outro parâmetro avaliado foram os açúcares redutores que servem para verificar se a fermentação alcoólica foi eficiente e ocorreu até ao fim de modo a consumir a maioria dos açúcares do mosto e serve também para classificar os vinhos. Para os vinhos espumantes este parâmetro caracteriza o tipo de vinho espumante consoante a concentração de açúcar residual no produto final podendo este ser: bruto natural, extra-bruto, bruto, extra-seco, seco, meio seco e doce. Neste caso como a média é de  $1,8 \pm 0,33$  g/L (teor em açúcares, expresso em glucose + frutose), enquadra o vinho base para espumante como seco que posteriormente dará origem a um vinho espumante bruto onde não poderá ter mais de 12 g/L (ver tabela nº 6 – 2.5.1. Vinho espumante).

Os mostos destinados aos vinhos espumantes de qualidade, aptos ao uso da DO “Alentejo”, devem ter um título alcoométrico volúmico natural no mínimo de 9,5% vol. (Artigo 8º ponto nº 2 alínea c) da Portaria 296/2010, de 1 de Junho) já os vinhos espumantes de qualidade com direito à DO “Alentejo” devem ter um título alcoométrico volúmico adquirido mínimo de 11% vol. (Artigo 10º ponto nº 1 alínea c) da Portaria 296/2010, de 1 de Junho), o vinho em estudo obteve uma média de  $10,58 \pm 0,44$  % v/v e estima-se que em média após a fermentação em garrafa o título alcoométrico aumente cerca de 1,5% v/v obtendo-se no final um vinho espumante com cerca de 12 % v/v. O teor alcoólico é um fator bastante importante na qualidade de um vinho visto que irá exercer influência ao nível organolético e para além disso terá um efeito antisséptico que permite inibir algumas bactérias o que torna este parâmetro bastante importante para a conservação do vinho. Tendo em conta os valores médios verificou-se um baixo teor alcoólico, o que permite a formação de aromas florais e frutados que são atributos importantes para um vinho espumante branco.

A acidez total para o vinho deve encontrar-se dentro dos 4 a 9 g/L de ácido tartárico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a) as amostras estudadas encontram-se todas dentro desta faixa ( $6,05 \pm 0,49$  g/L de ácido tartárico). A acidez depende do teor dos ácidos que o constituem, da sua força, da sua natureza química e da sua influência nas características aromáticas e sápidas dos vinhos (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

A acidez do vinho encontra-se diretamente relacionada com composição do mosto, especialmente o teor de potássio e cálcio e a predominância do ácido tartárico em relação ao ácido málico (Ribéreau-

Gayon *et al.*, 2006a). Uma vez que os ácidos fornecem atributos relativamente ao sabor e flavor ao vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a) é importante verificar este parâmetro de modo a garantir as melhores características ao produto final. Para além disso este parâmetro também é um indicador de controlo da qualidade do vinho, controlo da fermentação malolática, que no caso dos vinhos espumantes não existe porque pretende-se ter uma acidez mais alta comparativamente com os outros tipos de vinhos, contudo tem um papel importante na estabilização tartárica, microbiológica e na estabilidade da cor. A acidez total é um parâmetro indicador da qualidade do vinho, visto transmitir ao consumidor uma sensação de frescura, logo muito importante no vinho espumante. Segundo o *Regulamento (CE) N.º 491/2009 do Conselho de 25 de Maio 2009 no Anexo III- 1 d*), a acidez do vinho deverá ser igual ou superior a 3,5 g/L de ácido tartárico pelo que as amostras estudadas se encontram todas dentro do limite estabelecido. A acidez para além de interferir na cor e no aroma do vinho branco também confere resistência à oxidação, muito importante nos vinhos brancos de forma a manter a cor limpa e brilhante característica muito apreciada pelos consumidores. A acidez total é uma característica essencial dos vinhos, que irá contribuir para o sabor, frescura e capacidade de conservação. Assim sendo, a acidez do vinho tem uma participação importante nas características sensoriais e na estabilidade físico-química e biológica do vinho de aí ser importante avaliar sempre este parâmetro.

A acidez volátil pode indicar se o vinho sofreu alguma alteração e indicar o seu estado sanitário. Os valores encontrados foram baixos,  $0,54 \pm 0,09$  g/L ácido acético, e dentro dos limites legais (limite legal máximo é de 1,2 g/L de ácido acético), pelo que se pode considerar que do ponto de vista organoléptico não é perceptível o ácido acético nem o acetato de etilo. Os baixos valores de acidez volátil são um bom indicador da qualidade dos vinhos visto que estão relacionados com a utilização de uvas sadias no processo de vinificação. A quantidade de ácidos voláteis depende da composição do mosto, das condições fermentativas e da espécie de levedura utilizada. Como o acetato de etilo, é um derivado do ácido acético nos vinhos brancos este parâmetro não deve exceder os 0,88 g/L de ácido acético (OIV, 2015) pelo que as amostras analisadas apresentam ser bastante favoráveis quanto a este parâmetro analisado visto encontrem-se dentro deste limite. Esta análise é importante porque acima de certos limites, o vinho poderá ter um sabor ácido ou azedo assim como um aroma indesejável a vinagre e porque permite saber o estado de conservação do vinho.

Relativamente ao pH do vinho este depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de catiões, especialmente, do potássio e cálcio. Tem-se observado uma maior estabilidade em vinhos com pH entre 3,2 – 3,6, baixo teor de potássio e cálcio, presença de taninos complexos combinados a nanoproteínas, e condições de baixa oxigenação em meio de leve redução (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). O pH depende da natureza dos ácidos, das suas concentrações e da proporção em que se encontram saturados por bases, o vinho é uma bebida ácida, com um pH que oscila entre 2,8 e 3,8. Estes valores baixos são uma garantia de estabilidade e os vinhos estudados encontram dentro deste limite (a média obtida foi de  $3,18 \pm 0,04$ ). Para valores muito baixos de pH a colagem proteica dos vinhos brancos pode torna-se difícil (Curvelo-Garcia e Barros, 2015), pelo que é necessário manter o equilíbrio. O vinho é um meio menos ácido que o mosto que lhe dá origem,

uma vez que ao ocorrer a fermentação alcoólica muito do bitartarato de potássio e tartarato de cálcio neutro precipita, e o mesmo ocorre durante a conservação e envelhecimento do vinho. Os baixos valores de pH detetados, irão proporcionar uma sensação de frescura e aromas frutados e florais ao espumante. Pelo que se pode inferir que o pH é bastante importante para o vinho, visto que para além de interferir na cor, exerce um efeito pronunciado sobre o sabor. Os vinhos com pH elevado são mais suscetíveis às alterações oxidativas e biológicas, uma vez que o teor de dióxido de enxofre ativo é proporcionalmente menor. A maior acidez total e o menor pH dos vinhos, podem ser atribuídos ao menor conteúdo de potássio dos mostos uma vez que quanto menor a quantidade desse mineral, menor a precipitação do ácido tartárico na forma de bitartarato de potássio durante a vinificação (Chavarria *et al.*, 2008; Rizzon *et al.*, 1999; Rizzon e Miele, 2003).

A turbidez é um parâmetro bastante importante visto que os consumidores esperam um vinho límpido e cristalino. O vinho encontra-se estável quando a turbidez é baixa logo a propensão a precipitações após engarrafamento é baixa. A maioria do vinho analisado aprestou uma turbidez elevada apenas 14% dos vinhos base analisados apresentaram um valor abaixo de 4 NTU, isto pode ter ocorrido pelo facto de esta análise ter sido realizada apenas um mês depois de rececionada as amostras e durante o tempo de armazenagem ter ocorrido alguma precipitação proteica devido á baixa de temperaturas verificadas durante esse tempo.

Os sais minerais presentes no vinho proveem da parte solida da uva daí que os vinhos brancos apresentem um menor teor porque não sofrerem maceração nem prensagem com alta pressão (Jackson, 2008). De acordo com a *Portaria n.º 334/94 de 31 de Maio, 1994* para os vinhos brancos as cinzas deverão ser iguais ou superior a 1,6 g/L. O teor em cinzas é assim importante para o controlo da quantidade dos sais minerais nos vinhos base analisados neste estudo o valor médio obtido foi de 1,87 g/L o que se encontra dentro da legislação portuguesa. O teor de cinzas nos vinhos base avaliados é baixo o que indica que processo utilizado para a extração do mosto durante a vinificação foi o correcto não tendo existido um prolongado contacto direto com as películas (maceração) e sofreram uma prensagem suave (foi utilizado baixas pressões).

Os resultados médios das análises que se encontram dentro da caracterização do vinho base podem ser verificadas na tabela nº 18. Estas análises são fundamentais para conhecer as características do vinho em geral e saber se se encontram dentro dos limites estabelecidos dentro da sua gama e categoria. Os resultados mostram que todos se enquadraram nos padrões de identidade e qualidade estabelecidos por Lei. Estas análises são sempre importantes e essenciais pois são indicadoras da qualidade de um vinho indicando se este pode ser ou não colocado à venda. Isto acontece porque a qualidade depende e todas as ações realizadas no campo e no processo de vinificação. Para avaliar a qualidade química do vinho, ou seja o equilíbrio entre as substâncias químicas como açúcares, álcoois e ésteres provenientes da uva e do processo de vinificação é necessário a determinação das propriedades físico-químicas dos vinhos.

Tabela 18- Caracterização do vinho base analisado

<b>Parâmetros avaliados</b>	
<i>Densidade (g/L)</i>	0,9908 ± 0,0007
<i>Açúcares Redutores (g/L)</i>	1,82 ± 0,33
<i>Teor alcoólico (% v/v)</i>	10,58 ± 0,44
<i>Acidez total (g/L ácido tartárico)</i>	6,05 ± 0,49
<i>Acidez volátil (g/L ácido acético)</i>	0,54 ± 0,09
<i>pH</i>	3,18 ± 0,04
<i>Turbidez (NTU)</i>	35,33 ± 30,03
<i>Cinzas (g/L)</i>	1,85 ± 0,24

### 4.3 - Quantificação do azoto/proteína por Kjeldahl

Para a determinação de azoto e proteína no mosto e vinho base o método *Kjeldahl* apresentou ser uma melhor opção do que o método Dumas. Tentou-se avaliar a quantidade de azoto e consequentemente de proteína através do método Dumas com recurso ao Leco FP 2000 (LECO Co., St. Joseph, MO) das amostras de mosto e vinho base que foram previamente levadas à estufa. Contudo o processo de transferência da amostra seca para o cadinho de estanho verificou-se complicada existindo grande perda de amostra devido ao seu alto teor de açúcares no caso do mosto e de açúcar residual no caso do vinho, pelo que se optou por tentar analisar as amostras sem qualquer tipo de pré-tratamento, contudo os resultados não foram satisfatórios.

Pensa-se que o que não permitiu uma boa determinação do teor de azoto e consequentemente de proteína no mosto e no vinho base através do método de Dumas foi o facto de se ter como condicionante o tamanho do cadinho de estanho onde se colocava a amostra depois de pesada que entrava no equipamento *Leco FP 2000 (LECO Co., St. Joseph, MO)*, uma vez que após a leitura da amostra e subtraído o valor do branco o valor seria muito perto de zero. Isto indica que ao se utilizar uma toma de amostra de apenas 0,8 mL o teor de azoto/proteína encontra-se abaixo do limite de deteção do aparelho que é cerca de 1,2 mg/L de azoto contudo devido ao baixo volume possível de se colocar nos cadinhos de estanho as amostras, a maioria das amostras encontravam-se abaixo do limite de quantificação do aparelho pelo que se optou por realizar o método *Kjeldahl*.

Assim sendo só o método de *kjeldahl* apresentou ser um método preciso e adequado ao tipo de amostra, tendo-se obtido um desvio padrão relativo de cerca de 8,19 % indicando que o método apresenta uma boa precisão acima dos 90% e um desvio padrão médio de 0,12 mg/L.

Tabela 19- Parâmetros avaliados para o método Kjeldahl

<b>Azoto</b>	
<i>Precisão</i>	91,81 %
<i>Limite de deteção</i>	0,4 mg/L
<i>Limite de quantificação</i>	1,21 mg/L

Verificou-se que o passo mais crítico do método *Kjeldahl* foi o processo de oxidação dos compostos orgânicos através do ácido sulfúrico, pelo que é importante garantir que a digestão ocorra por completo. Para além disso verificou-se que para a aumentar a precisão do método é necessário dedicar especial atenção processo de aumento de temperatura de forma a que este não seja tumultuoso para que não ocorra perdas de amostra e consequentemente se obtenha uma quantificação por defeito e um elevado valor de desvio padrão entre amostras iguais.

Na maioria das adegas, é prática comum adicionar fosfato de diamónio ou sulfato de amónio ao mosto antes da fermentação sem terem efetuado estudos anteriores dos teores de azoto na composição do mosto pelo que a determinação da concentração inicial de compostos azotados seria importante de modo a evitar adições desnecessárias de azoto, para posteriormente evitar efeitos negativos nos vinhos devido ao seu excesso (Garde-Cerdán *et al.*, 2011; Vilanova *et al.*, 2007). Sempre que o azoto assimilável no mosto for inferior a 150 mg/L deve-se adicionar fosfato de diamónio ou sulfato de amónio, contudo é necessário efetuar os cálculos fazendo a diferença entre o necessário e o existente para não se adicionar mais do que necessário e assim reduzir custos económicos com a comprar de sulfato de amónio e posteriormente com tratamentos necessários para corrigir defeitos derivados da adição em excesso do sulfato de amónio que poderá ser inclusive prejudicial à sobrevivência das leveduras, à fermentação malolática e à qualidade sensorial dos vinhos (odores a compostos de enxofre). De acordo com a literatura, as concentrações de azoto assimilável devem estar entre os 150 a 400 mg/L para que a fermentação alcoólica ocorra sem percalços (Bell e Hebschke, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

O teor de azoto encontrado no mosto foi de  $164,14 \pm 20,48$  mg/L para o Alvarinho e  $188,78 \pm 12,74$  mg/L, o que se encontra dentro do valor obtido por Veiga, 2014 para a casta Alvarinho 112, 29 mg/L e para o Arinto 136,79 mg/L, e de Fenocino e Pezzi (1976) onde o teor total de azoto médio encontrado foi de 174,7 mg/L e 210, 9 mg/L respetivamente.

No vinho base o teor de azoto foi de  $141,44 \pm 9,51$  mg/L, valores acima dos referenciados por Moreno-Arribas (2000) e por Sirén, Sirén e Sirén (2015), contudo, próximos dos valores obtidos por Pozo-Bayón *et al.* (2010), Silva *et al.* (2000) e Moreno-Arribas (2000) onde o teor de azoto total permaneceu entre 73,5 e 267,75 mg/l para os vinhos branco secos. As fontes de azoto desempenham um papel crítico na aclimação de estirpes de levedura. A modificação da composição azoto durante esta fase é proposto como uma ferramenta para otimizar o desempenho de levedura durante a segunda fermentação (Martí-Raga, Marullo, Beltran, & Mas, 2016).

Verificou-se que o azoto no mosto é maior do que no vinho base mas a diferença não foi muito grande e tal facto pode em parte dever-se às quantidades de azoto adicionadas inicialmente ao mosto. Outra causa possível para as diferenças encontradas poderá resultar da autólise das leveduras durante a fermentação, armazenamento e envelhecimento do vinho (Martínez-Rodríguez e Polo, 2000). Martí-Raga *et al.*, 2015) observaram no vinho de base que o teor de azoto se encontrava dentro dos 30 mg/L e que esta concentração seria suficiente para que a segunda fermentação ocorra normalmente pelo que os valores encontrados neste estudo em nada irão comprometer a segunda fermentação em garrafa.

Um dos principais factores que afetam a estabilidade do vinho branco durante o seu armazenamento é a instabilidade proteica (Batista *et al.*, 2009; Esteruelas *et al.*, 2009; González, 2007; Ferreira *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2005). A sua quantificação é importante devido à sua relação com a estabilidade do vinho (Esteruelas *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2005) e em alguns casos com o impacto organolético como no caso dos vinhos espumante devido à produção da espumante característica bastante apreciada pelos consumidores neste tipo de vinho. Além de contribuírem para o enriquecimento do sabor e aroma, algumas proteínas, as manoproteínas, vão contribuir para a estabilização das borbulhas (Ferreira, *et al.*, 2002; Mesquita *et al.*, 2001), outra característica também bastante apreciada pelos consumidores.

Apesar de os polissacarídeos serem os principais componentes de elevado peso molecular nos vinhos ao contrário das proteínas que ocorrem apenas em pequenas quantidades no vinho, são estas que mais contribuem para a formação de turvação (Jaeckels *et al.*, 2016). As proteínas, apesar de existirem em baixa concentração no vinho (15 a 300 mg/L), são dos constituintes mais importantes na estabilidade coloidal, podendo afetar a sua limpidez e conseqüente estabilidade. Como se pode comprovar pela figura nº 37 existe uma correlação positiva com o teor de proteína no vinho (fração proteica) e a sua turbidez. Tal acontece porque devido à natureza coloidal dos agregados de proteína estes dispersam a luz na região do comprimento de onda no visível, sendo assim calculada a turvação de uma solução, o que explica a relação entre a turbidez e o teor em proteína (Hall *et al.*, 2016).

A solubilidade de cada fração proteica, irá ser diferente sendo isto em parte influenciada pelo pH do vinho (Batista *et al.*, 2009; Lambri *et al.*, 2013) o que salienta a importância das análises de caracterização do vinho. Para além disso as proteínas irão influenciar uma das características do vinho espumante mais apreciada pelo consumidor uma vez que contribuem para a formação e estabilização da espuma. Isto acontece porque as proteínas possuem a capacidade de diminuir a tensão interfacial, e aumentar as propriedades viscosas e elásticas devido à formação de pontes de hidrogénio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Torresi, Frangipane e Anelli, 2011).

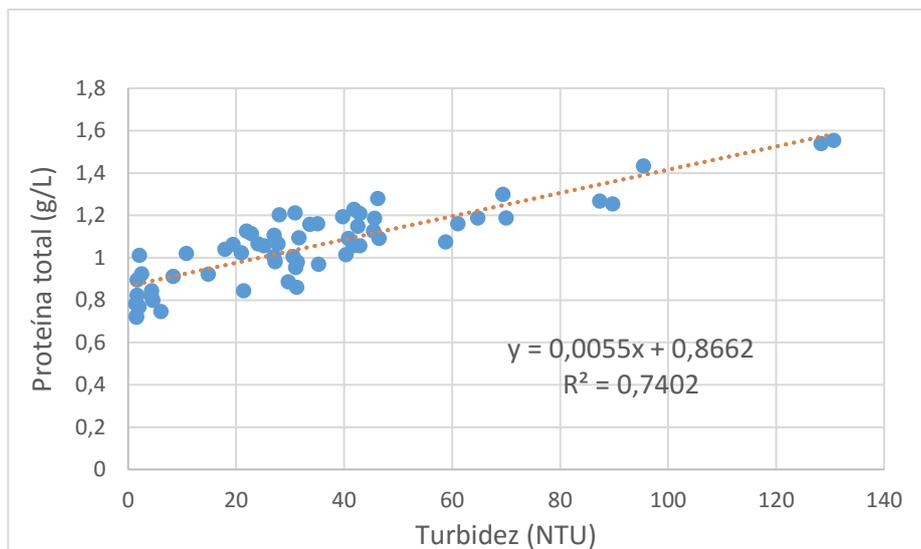


Figura 37 - Correlação positiva entre o teor de proteína no vinho e a turbidez

#### 4.4 - Quantificação do cálcio, potássio e magnésio por EAA no mosto e vinho base

Alguns elementos minerais encontram-se solubilizados no mosto e no vinho sob a forma de sais orgânicos (tais como tartaratos, malatos, succinatos, acetatos) de sais minerais (tais como cloretos, sulfatos e fosfatos) e de complexos orgânicos com outras espécies químicas (Catarino, Curvelo-Garcia e Sousa, 2008). A forma química em que o catião se encontra no vinho condiciona muito a sua biodisponibilidade e toxicidade (Guardia e Garrigues, 2015; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). O conteúdo mineral de um vinho poderá, consoante a sua concentração, originar fenómenos depreciativos da sua qualidade tais como turvações, precipitações e oxidações, daí a importância de tornar a análise dos elementos minerais num parâmetro de rotina que se possa realizar rapidamente e de forma económica dentro de uma adega.

Tendo em conta as características mencionadas anteriormente (2.14.3 – Espectroscopia de infravermelho próximo) para este estudo optou-se por utilizar a espectroscopia de infravermelho próximo como substituto da Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) e do método *kjeldahl*. Optou-se pela EAA para determinar o cálcio, potássio e magnésio porque para além de ser considerada o método de referência esta técnica apresenta limites de deteção para os minerais em estudo bastante aceitáveis. Na literatura pode-se encontrar para o Cálcio um limite de deteção de 1 ng/mL, para o Potássio 2 ng/mL e para o Magnésio de 0,2 ng/mL (Skoog *et al.*, 2006).

Para a análise dos minerais cálcio, potássio e magnésio recorreu-se a espectrometria de absorção atômica.

Como estas leituras foram efetuadas no equipamento do Laboratório da Água da Universidade de Évora houve necessidade de implementar validar o método para que se pudesse posteriormente utilizar os dados para a calibração do aparelho de infravermelho próximo.

O processo de validação realizado pretende uniformizar os critérios utilizados de modo a demonstrar que os métodos de ensaios executados, nas condições em que foram exercidos, têm as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. O procedimento para validação de um método de ensaio exige uma avaliação da calibração analítica pelo que se realizou um estudo da linearidade da reta de calibração, determinou-se o limite de quantificação, realizou-se um estudo da repetibilidade e um estudo da sensibilidade e seletividade do método.

Para a validação da quantificação do cálcio ambos os parâmetros avaliados se encontram dentro dos parâmetros legais estabelecidos. A reta de calibração obtida contém um coeficiente de correlação de 0,999 (Figura nº 38) o que é aceitável visto que o critério aplicado para que uma calibração analítica seja satisfatória é que o valor seja superior a 0,9950 (EPA, 2000). O mesmo coeficiente de correlação foi obtido em estudos realizados por Gomes (2012) e Santos *et al.* (2014). Garantiu-se sempre que todas as amostras lidas se encontravam dentro da reta, quando tal não acontecia procedeu-se sempre a diluição da amostra e nova leitura.

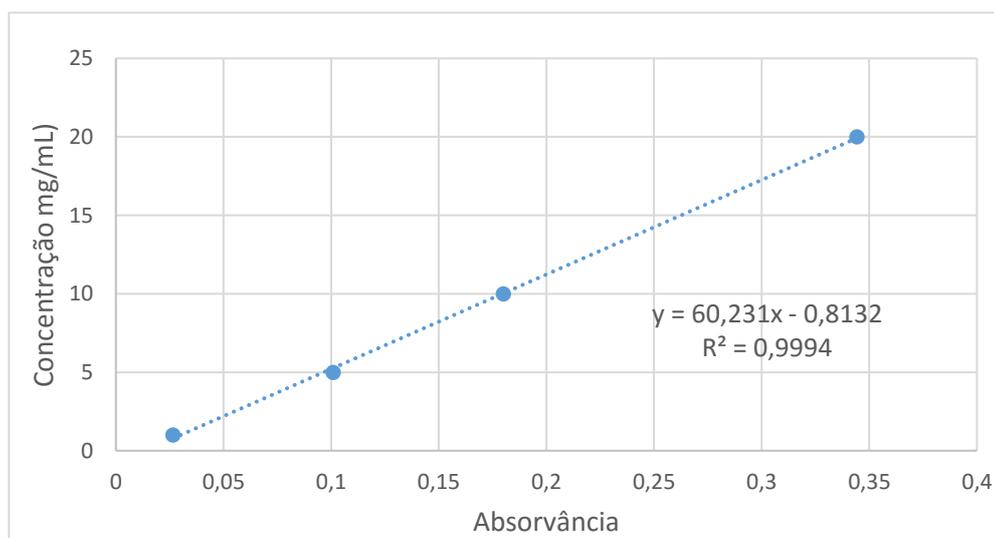


Figura 38 - Reta de calibração obtida para a análise do cálcio por EAA

Tabela 20- Parâmetros para validar a determinação do cálcio por EAA

<b>Cálcio</b>	
<i>Linearidade</i>	0,999
<i>Limite de detecção</i>	0,15 mg/L
<i>Limite de quantificação</i>	0,48 mg/L
<i>Exatidão</i>	99,15%
<i>Precisão</i>	4,04
<i>% Recuperação</i>	98,13%

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,15 mg/L e 0,48 mg/L, respetivamente. O limite de detecção encontra-se dentro dos valores encontrados na literatura (tabela nº 20) contudo o limite de quantificação foi um pouco elevado, isto poderá dever-se às condições instrumentais, pelo que de futuro poder-se-á utilizar um fluxo menor.

Tabela 21- Valores de limite de detecção e quantificação encontrados na literatura para a leitura do catião cálcio

<b>Autor</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação</b>
(Ozbek e Akman, 2016)	0,036 ug/mL	0,118 ug/mL
(Gómez-Nieto <i>et al.</i> 2015)	0,099 mg/L	0,33 mg/L
(J. Santos <i>et al.</i> , 2014)	0,240 ug/g	0,720 ug/g
(Ieggli <i>et al.</i> , 2011)	0,16 mg/L	-
(Zmozinski <i>et al.</i> , 2010)	1,2 ug/g	-
(Frias <i>et al.</i> , 2001)	0,209 ug/mL	

A determinação do cálcio apresenta ser exata uma vez que se obteve uma exatidão de 99,15% e uma taxa de recuperação de 98,13% o que se encontra dentro dos limites estabelecidos (95-105%).

Para a validação da medição do teor de potássio ambos os parâmetros avaliados se encontram dentro dos parâmetros legais estabelecidos. A reta de calibração obtida contém um coeficiente de correlação é de 0,998 (Figura nº 39) o que é aceitável visto que o critério aplicado para que uma calibração analítica seja satisfatória é que o valor seja superior a 0,9950. Garantiu-se que todas as amostras lidas se encontravam dentro da reta.

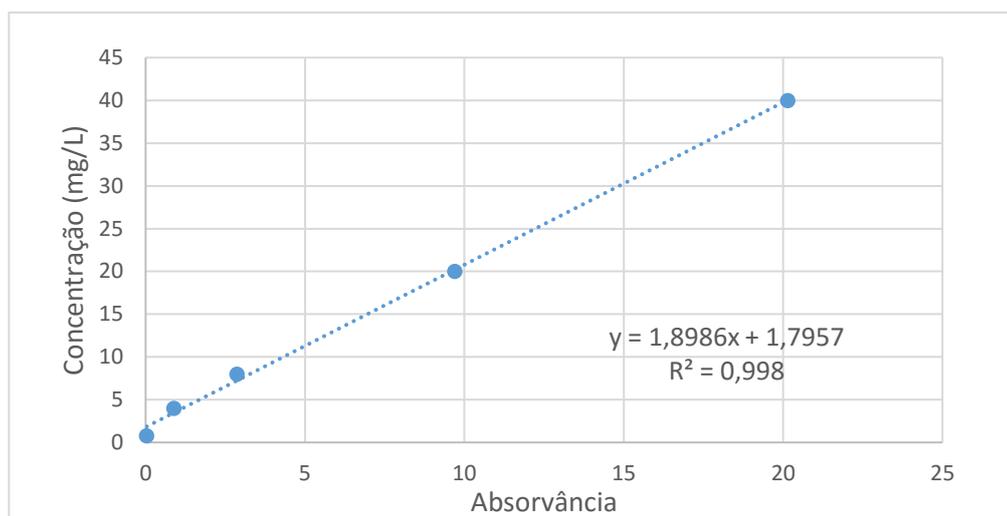


Figura 39 - Reta de calibração utilizada para a determinação do potássio

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,08 mg/L e 0,22 mg/L respetivamente, e encontram-se dentro dos valores aceitáveis. Na literatura os valores encontram-se dentro da mesma gama (tabela nº 39).

Tabela 22 – Parâmetros para validar a determinação do potássio por EAA

<b>Potássio</b>	
<i>Linearidade</i>	0,998
<i>Limite de deteção</i>	0,08 mg/L
<i>Limite de quantificação</i>	0,22 mg/L
<i>Exatidão</i>	99,86%
<i>Precisão</i>	2,39
<i>% Recuperação</i>	98,53%

Tabela 23 - Valores de limite de deteção e quantificação encontrados na literatura para a leitura do catião potássio

<b>Autor</b>	<b>Limite de deteção</b>	<b>Limite de quantificação</b>
(Ozbek e Akman, 2016)	0,19 ug/mL	0,63 ug/mL
(Gómez-Nieto <i>et al.</i> , 2015)	0,032 mg/L	0,11 mg/L
(J. Santos <i>et al.</i> , 2014)	0,438 ug/g	1,316 ug/g
(Ieggli <i>et al.</i> , 2011)	0,05 mg/L	-
(Jesus, Silva e Vale, 2008)	0,06 ug/g	-
(Frias <i>et al.</i> , 2001)	0,019 ug/mL	-

A determinação do potássio apresenta ser extada uma vez que se obteve uma exatidão de 99,86% e uma taxa de recuperação de 98,53% o que se encontra dentro dos limites estabelecidos (95-105%).

Para a validação da medição do teor de magnésio ambos os parâmetros avaliados se encontram dentro dos parâmetros legais estabelecidos. A reta de calibração obtida contem um coeficiente de correlação é de 0,9991 (figura nº 40) o que é aceitável visto que o critério aplicado para que uma calibração analítica seja satisfatória é que o valor seja superior a 0,9950. Garantiu-se que todas as amostras lidas se encontravam dentro da reta.

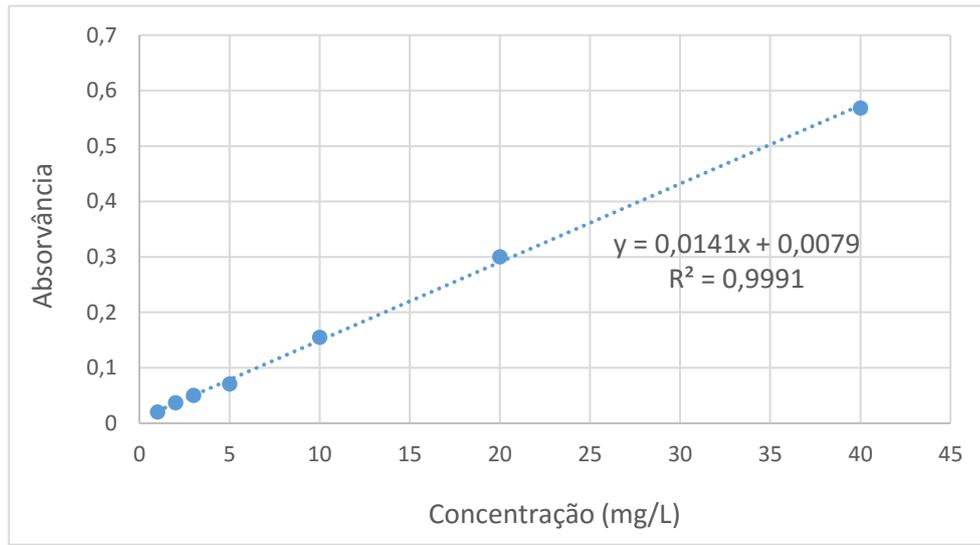


Figura 40 - Reta de calibração utilizada para a determinação do magnésio

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram: 0,05 mg/L e 0,16 mg/L respectivamente. Estes valores encontram-se dentro dos valores aceitáveis. Na literatura os valores estão dentro da mesma gama de valores (tabela nº 24).

A determinação do potássio apresenta ser exata uma vez que se obteve uma exatidão de 99,86% e uma taxa de recuperação de 100,38% o que se encontra dentro dos limites estabelecidos (95-105%).

Tabela 24 - Parâmetros para validar a determinação do magnésio por EAA

<b>Magnésio</b>	
<i>Linearidade</i>	0,9991
<i>Limite de detecção</i>	0,05 mg/L
<i>Limite de quantificação</i>	0,16 mg/L
<i>Exatidão</i>	98,98%
<i>Precisão</i>	4,36
<i>% Recuperação</i>	100,38%

Tabela 25 - Valores de limite de detecção e quantificação encontrados na literatura para as leituras do cálcio e magnésio

<b>Autor</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação</b>
(Gómez-Nieto <i>et al.</i> , 2015)	0,13 mg/mL	0,42 mg/mL
(Morzan, Stripeikis e Tudino, 2015)	0,021 mg/L	0,068 mg/L
(Santos <i>et al.</i> , 2014)	0,08 mg/g	0.21 mg/g
(leggli <i>et al.</i> , 2011)	0,03 mg/L	-
(Zmozinski <i>et al.</i> , 2010)	0,052 ug/L	-
(Giokas <i>et al.</i> , 2002)	0,75 ug/L	-
(Frias <i>et al.</i> , 2001)	0,056 ug/mL	-

Para todas as leituras o coeficiente de variação do sinal não foi superior a 10%, as poucas leituras em que a variação foi superior a 10% foram lidas novamente, para que a quantificação dos diferentes cátions fosse o mais fiável possível para se garantir os melhores resultados para realizar a calibração com a espectrometria de infravermelho próximo.

O limite de quantificação após ter sido determinado foi testado. Preparou-se uma solução padrão de concentração próxima da obtida para cada elemento (Cálcio: 0.50 mg/L; Potássio: 0.30 mg/L e Magnésio: 0.20 mg/L). Fez-se dez leituras de cada padrão e o desvio padrão não foi superior a 10 % (tabela nº 26), pelo que se pode afirmar que se obteve um bom ajuste do limite de quantificação. Os baixos valores de LOD e LOQ pode ser atribuído à utilização de uma chama mais quente, ar/acetileno, o que aumenta bastante a sensibilidade da análise (Skoog *et al.*, 2006).

Tabela 26 – Valores de RSD para os padrões de concentrações mínimas

<b>Padrão</b>	<b>% RSD</b>
<i>Cálcio 0,5 mg/L</i>	8,14
<i>Potássio 0,30 mg/L</i>	7,42
<i>Magnésio 0,2 mg/L</i>	7,29

É importante salientar que o ensaio em brancos é um ensaio que se deve realizar em todos as metodologias analíticas uma vez que permite avaliar a incidência de contaminações provenientes do material, dos reagentes, da atmosfera do laboratório, e também de todo o processo de manipulação pelo que se pode considerar uma ferramenta de controlo da qualidade interno. Neste estudo, tanto na determinação de azoto/proteína como na determinação dos minerais cálcio, potássio e magnésio foram realizados ensaios em branco.

Para a determinação dos minerais em estudo optou-se por analisar o vinho base diretamente sem qualquer tratamento da amostra, apenas se efetuou a diluição necessária para que a amostra entrasse dentro da gama de leitura de cada elemento e por último analisou-se a digestão ácida das cinzas do vinho. Como se pode verificar nas figuras 41, 42 e 43 a quantificação de ambos os catiões foi mais baixa no vinho do que na digestão ácida das cinzas. Outro ponto a analisar foi a variação do sinal (*relative standard deviation*) obtida e aqui o valor da variação foi mais alta na análise direta ao vinho: 8,4% para o cálcio, 9,1% para o potássio e 8,1 % para o magnésio e para a análise da digestão ácida do vinho foi: 7,9% para o cálcio, 7,6 % para o potássio e 7,5 % para o magnésio.

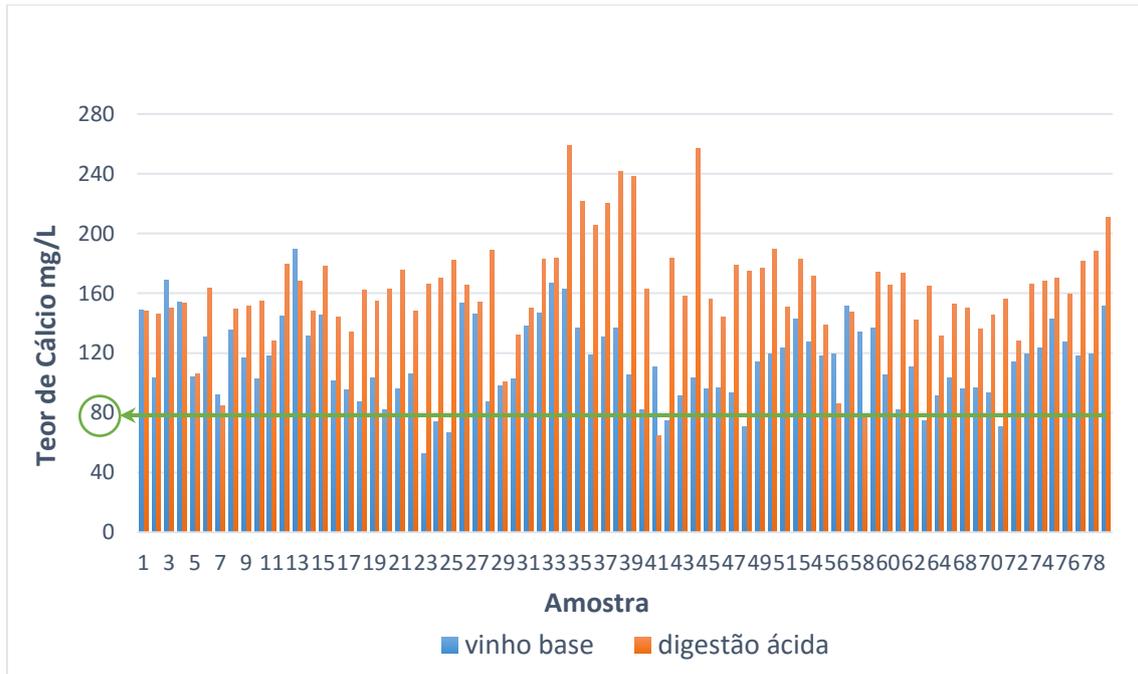


Figura 41-- Comparação entre a quantificação do cálcio diretamente no vinho base e através da digestão ácida do vinho

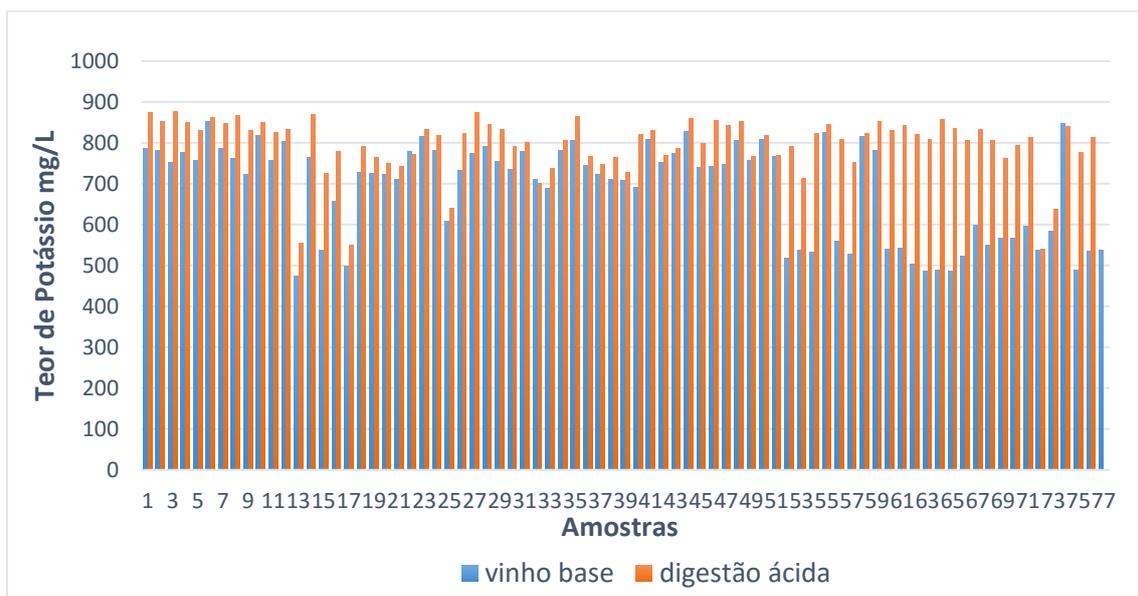


Figura 42 - Comparação entre a quantificação do potássio diretamente no vinho base e através da digestão ácida do vinho

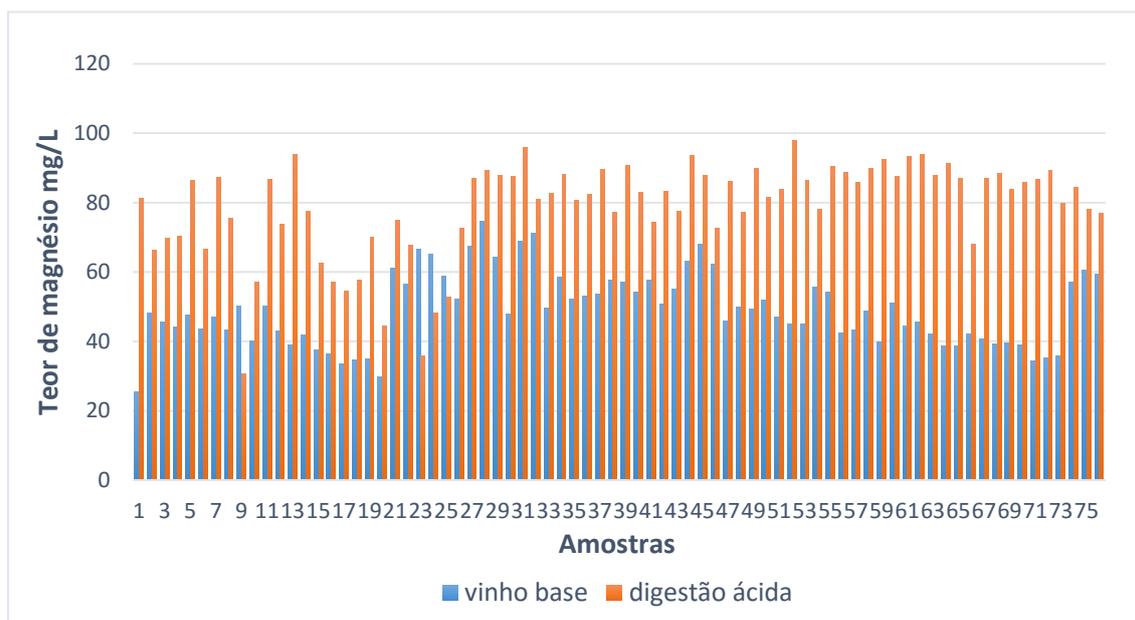


Figura 43 - Comparação entre a quantificação do magnésio diretamente no vinho base e através da digestão ácida do vinho

Como se obteve um valor de quantificação menor no vinho base para todos os minerais, optou-se por utilizar os valores obtidos pela análise da digestão ácida das cinzas do vinho base para se proceder à calibração do aparelho de espectrometria de infravermelho próximo. Tal como foi observado por Grindlay *et al.*, 2011 os efeitos da matriz do vinho base podem ser eficientemente mitigados pela selecção adequada do método de pré-tratamento da amostra (como a digestão ácida), assim como pela estratégia de calibração, configuração instrumentação e das condições experimentais seleccionadas antepadamente.

Na tabela nº 27 encontram-se os valores médios obtidos para cada mineral, analisado por EAA. Apesar de se verificar que os mostos apresentam teores mais elevados de cálcio, magnésio e potássio do que o vinho, estes minerais, no vinho, ainda continuam a ter teores muito elevados. O cálcio e o magnésio são componentes naturais do mosto, contudo a utilização de carbonatos (como desacidificantes) aumentam as suas concentrações no vinho, relativamente ao potássio. Para além deste ser o catião predominante no mosto da *Vitis vinifera*, poderá também ser adicionado sob a forma de metabissulfito ou carbonato durante o processo de vinificação (Marengo e Aceto, 2003). Ou seja apesar do mosto e do vinho sofrerem filtrações e clarificações e isso faça com que o teor mineral diminua, estes minerais são também adicionados durante o processo de vinificação e também libertados durante a autólise das leveduras.

Na tabela nº 27 pode-se observar que o potássio é o mineral em maior concentração no vinho, assim como é o mineral em maior concentração no solo e na planta tal como observado por Oliveira *et al.*, 2001.

Tabela 27- Concentração média dos minerais com os respectivos desvio padrão encontrados no mosto e vinho base analisado por EAA

<i>Minerais</i>	<i>Concentração (mg/L) no mosto (n=60)</i>	<i>Concentração (mg/L) no vinho (n=78)</i>
<i>Potássio</i>	885,19 ± 115,21	795,39 ± 70,27
<i>Cálcio</i>	162,07 ± 35,04	114,79 ± 27,1
<i>Magnésio</i>	88,24 ± 19,37	78,81 ± 13,76

O teor de potássio das amostras analisadas por EAA variou entre os 540 e os 877 mg/L para o vinho e entre os 628 e os 901 mg/L para o mosto, valores que vão ao encontro dos observados por Gómez *et al.*, (2004). A determinação do teor de potássio é importante porque para além de ser o principal catião do vinho, com teores entre 0,5 e 2g/L, irá determinar o processo de cristalização do bitartarato de potássio que é perfeitamente solúvel em água e é relativamente insolúvel em álcool.

A quantidade de magnésio no vinho base analisado variou entre os 13,56 e os 97,85 mg/L, enquanto que para o mosto variou entre os 45,41 e os 100,69 mg/L. O valor médio obtido por Sauvage *et al.*, (2002) para os vinhos australianos a gama obtida foi de 70-100 mg/L. Kment *et al.*, (2005) verificaram que o magnésio exibia uma dependência estatisticamente significativa entre o seu conteúdo em solos e vinhos (correlação = 0,616). Isto significa que o teor de magnésio no vinho é dependente da sua concentração no solo da vinha e que a fonte deste elemento no vinho é muito provavelmente em grande parte do solo. Por outro lado, o conteúdo dos outros catiões ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) no solo e vinho é independente entre si, por duas razões: a seletividade da absorção dos iões individuais no substrato de solo e as diferentes distribuições entre as partes individuais da planta: o transporte de iões inorgânicos pela planta ocorre principalmente entre as raízes e as folhas, onde ocorre a transpiração, sendo o transporte das raízes ao fruto o menos importante (Kabata-Pendias e Pendias, 1984) e porque os elementos minerais podem derivar das fertilizações utilizadas.

É importante determinar o teor de magnésio uma vez que este é um importante constituinte da videira, do mosto e do vinho. Apesar de ser encontrado em maior concentração nos vinhos tintos, devido a uma maior extração inicial e maior liberação do mineral para o mosto durante o período de maceração (Manfroi *et al.*, 2006), os teores de magnésio normalmente encontrados no vinho variam entre os 50 a 120 mg/L e podem contribuir para a tipicidade dos vinhos de uma determinada região vitícola (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a) daí a sua importância em analisar o seu teor no vinho.

Os valores de cálcio obtidos através da EEA nos vinhos estudados variam entre os 64,69 e os 230,10 mg/L (que segundo Flanzky (2000) pode variar entre 30 a 200 mg/l) e no mosto variaram entre os 62,78 e 259,05 mg/L. Num estudo sobre vinhos espanhóis a média encontrada para o teor de cálcio foi de 60,7 mg/L com uma gama de 22,5-134,0 mg/L enquanto que Rodríguez Mozaz *et al.* (1999) observaram que os vinhos brancos alemães variavam entre os 60-140 mg/L. É interessante notar que

a gama de teores de cálcio parece ser da mesma ordem de grandeza, independentemente do país de origem.

A presença de cálcio no mosto é benéfica uma vez que este irá reagir com os fosfatos orgânicos do mosto e auxiliar na formação de fosfatos ácidos que irão diminuir o pH, melhorar a atividade enzimática durante a fermentação e irá proteger as  $\alpha$ -amilases que se tornam inativas com o aumento da temperatura. Este catião tem que existir em quantidade suficiente para precipitar o oxalato de modo a evitar que o vinho tenha problemas de estabilidade. A contribuição para o teor de cálcio nos vinhos brancos pode vir da bentonite de cálcio. Num estudo realizado por McKinnon (1997) os vinhos brancos secos variam entre os 73 e 130 mg/L. Contudo o teor de cálcio nos vinhos base não poderá ser superior a 80 mg/L (por motivos já referidos anteriormente) mas ao se verificar a figura nº 41, 90% do vinho analisado apresenta um teor de cálcio acima do limite estabelecido para a utilização das leveduras de alginato encapsuladas. Para além disso considera-se a concentração de 80 mg/L de cálcio o valor limite de segurança para evitar problemas de precipitação de tartaratos de cálcio. A precipitação deste sal é pouco sensível á temperatura, sendo que a temperatura ótima para o crescimento de cristais e precipitação situa-se entre os 5 e 10°C, podendo demorar meses a atingir uma estabilidade espontânea. Os elevados teores de cálcio encontrados neste estudo ressaltam a necessidade de analisar o vinho tendo em conta este parâmetro para que se possa evitar durante a segunda fermentação em garrafa a aglomeração das esperas de alginato. Tal como se torna necessário conhecer o teor de cálcio assim que as uvas dão entrada na adega para que de futuro se possam desde logo dar um melhor encaminhamento às uvas consoante as suas características. A determinação do teor de cálcio parece ser necessária para também para monitorizar possíveis precipitações de bitartarato de cálcio, que ocorrem lentamente e, geralmente no vinho já engarrafado (Rizzon e Miele, 2004). Outra razão para o estudo destes macroelementos prende-se com o facto de o potássio, cálcio, magnésio e o sódio (não avaliado neste estudo) regulam o metabolismo celular e mantêm o pH e o equilíbrio iónico no citoplasma das leveduras logo irão influenciar a fermentação do vinho (Jackson, 2008). Uma vez que Segundo Catarino, Curvelo-Garcia e Sousa (2008), alguns metais alcalinos e alcalinoterrosos, tais como sódio, potássio, magnésio e o cálcio são os principais responsáveis pela “estrutura metálica” dos vinhos e pela sua capacidade tampão ácido-base.

Em seguida apresenta-se uma tabela com o resumo do teor de minerais obtidos por outros autores em vinho branco.

Tabela 28 – Resumo dos teores minerais encontrados na literatura para o vinho derivado de uvas brancas

Autor	Tipo de vinho analisado	Cálcio mg/mL		Potássio mg/mL		Magnésio mg/mL	
		Média	Gama	Média	Gama	Média	Gama
Rizzon, Miele, e Scopel 2009	Vinhos Riesling	94,5	84,5 - 104,5	704	555 - 860	72,9	67,2 - 78,6
Jos <i>et al.</i> 2004	Espumante bruto	98	59 - 122	394	338 a- 490	82	58 - 105
Álvarez, <i>et al.</i> , 2012	Vinho branco espanhol	82,6	44,6 - 133,5	865,3	485,7 - 1311,4	68,9	44 - 93,6
Rizzon, Miele, e Scopel 2009	Chardonnay	86,6	81,4 - 91,8	705	641 - 768	75,2	74,3 - 79,8
Chavarria <i>et al.</i> , 2011	Vinho branco ( <i>Moscato giallo</i> )	56,5	-	105,9	-	142	-
Silva <i>et al.</i> , 1998	Vinho branco seco	158,4	103,6 - 235,5	787,5	502,5 - 560	51,6	20,7 - 92,9

Com o objetivo de verificar se os minerais cálcio, potássio e magnésio das folhas é um bom indicador desses mesmo minerais no vinho efetuou-se as seguintes correlações. Visto que se analisou amostras de análise de solo e foliar que correspondiam as maiores parcelas utilizadas para a vinificação de dez dos vinhos analisados compararam-se os resultados. Pelo que se pode verificar na seguinte tabela quanto maior o teor de cálcio nas folhas maior o teor de cálcio no vinho podendo-se observar que tal como esperado o teor de minerais no vinho está em parte relacionado com as características e adubações do solo. A mesma relação se verificou para os outros minerais estudados como se pode observar pelas figuras 45 e 46.

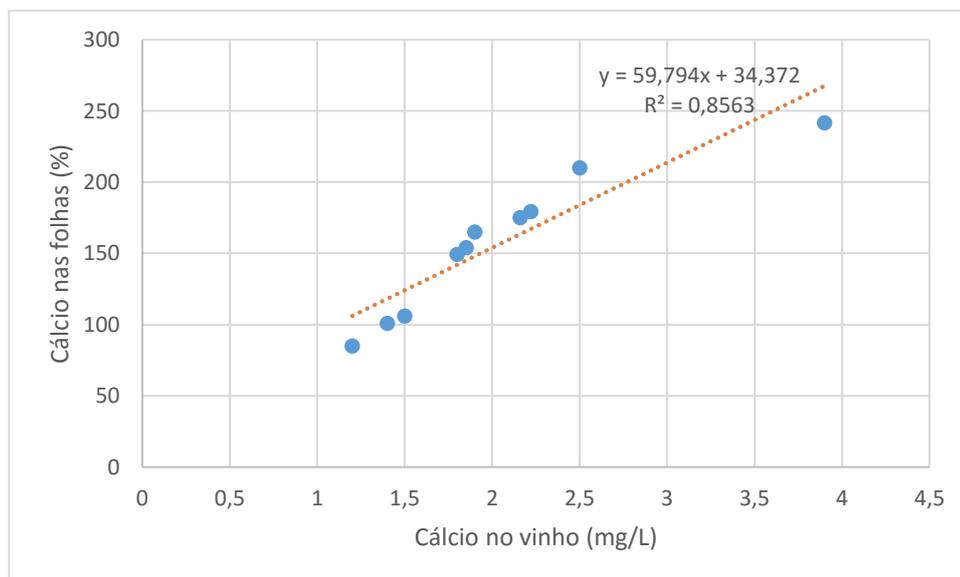


Figura 44 - Comparação entre o teor de cálcio nas folhas e no vinho base

Na figura nº 44 é perceptível que quanto maior o teor de cálcio nas folhas maior o teor de cálcio no vinho o que esta de acordo com os resultados de (Pagani, 2008) que concluíram que o teor de minerais no vinho está relacionado com as características e fertilização do solo

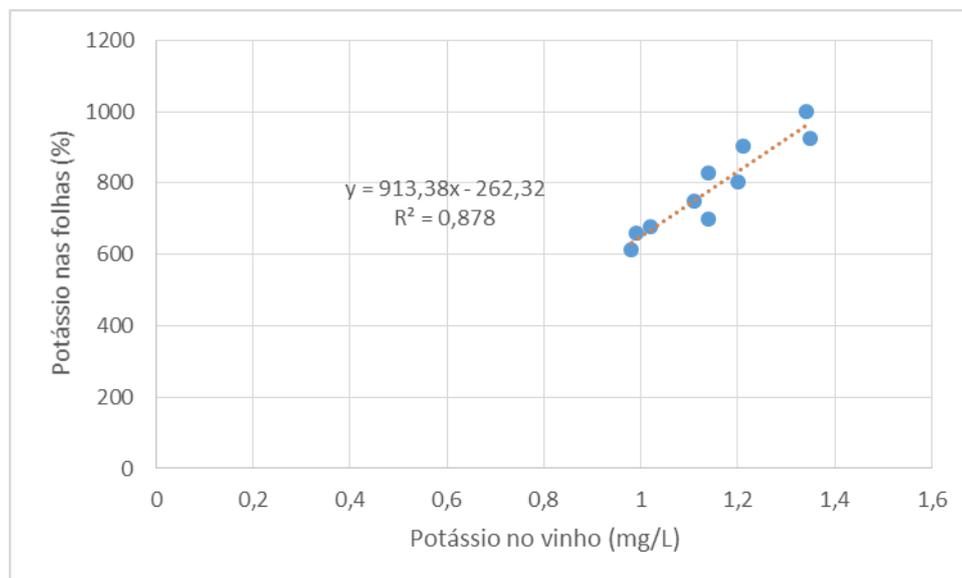


Figura 45 - Comparação entre o teor de potássio nas folhas e no vinho base

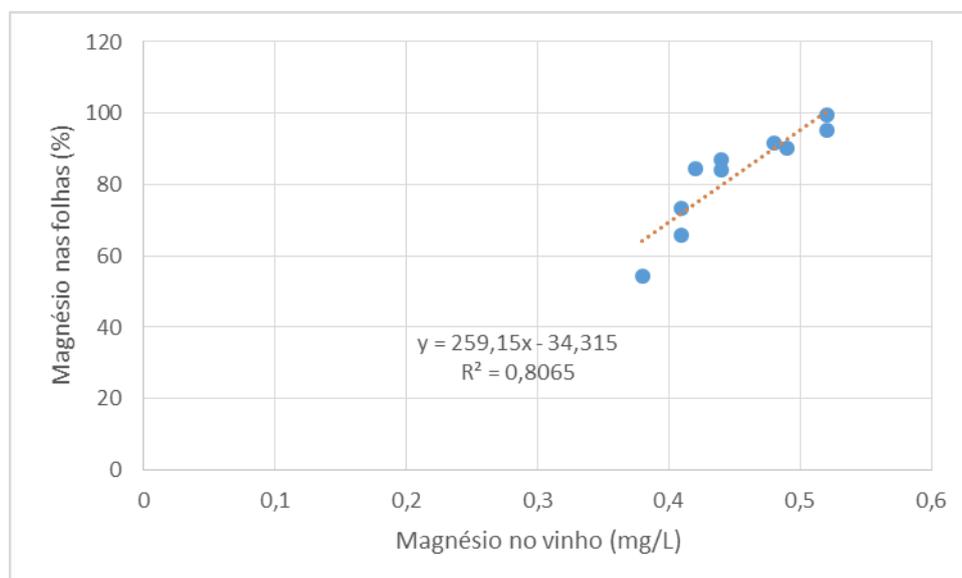


Figura 46 - Comparação entre o teor de magnésio folhas e no vinho base

Segundo um estudo realizado por Frias *et al.* (2001) e Kmet *et al.* (2005) os teores médios dos principais elementos nos vinhos por eles estudados diminuiu na ordem  $K > Ca > Mg$  tal como se verificou neste estudo e que os teores de cálcio e magnésio nos solos foram fortemente influenciados pela composição das rochas-mãe (Kment *et al.*, 2005).

#### *4.5 -Calibração do aparelho com tecnologia de infravermelho próximo*

Para que se realize uma boa análise quimiométrica é necessário que os dados espectrais recolhidos sejam de boa qualidade ou seja ter-se-á que ter em conta a precisão do comprimento de onda, resolução, precisão fotométrica e relação sinal-ruído (Gauglitz, Günter and Vo-Dinh, 2003). Sempre que se vai utilizar o aparelho pela primeira vez no dia executou-se o teste do branco ótico, de modo a garantir que o equipamento funciona corretamente.

As amostras foram separadas em dois conjuntos, o conjunto da calibração que foram utilizados para estabelecer o modelo e o conjunto de validação que foram utilizados para testar a robustez do modelo estabelecido (Ouyang, Chen e Zhao, 2016), contudo ambos os conjuntos contem poucas amostras devido ao reduzido tempo e orçamento para realizar os métodos analíticos de referência, o conjunto de calibração contem 79 amostras e o de validação foi construído com apenas 20 amostras. Para as calibrações com o mosto apenas existia um conjunto de dados com 60 amostras pelo que se teve de optar por uma validação cruzada.

Devido ao facto de o espectro conter sempre variações de fundo que surgem a partir do espalhamento provocado pelas partículas em suspensão, variações de temperatura e ruído instrumental é necessário proceder-se sempre a um pré-tratamento dos dados.

A análise de regressão multivariada foi realizada, para cada parâmetro estudado, através do programa The Unscrambler® 10.3. Antes de se aplicar a regressão multivariada procedeu-se ao pré-processamento dos espectros tendo-se optado pelas modelações que facultaram um modelo com maior coeficiente de correlação entre os dados preditos e os dados de referência e um erro relativo menor.

Na figura nº 47 encontram-se todos os espectros em bruto obtidos das amostras analisadas pelos métodos de referência que irão ser utilizados para se obter o modelo de calibração. Através de uma avaliação visual rápida é possível verificar que os dados deverão ser tratados antes de se iniciar a calibração.

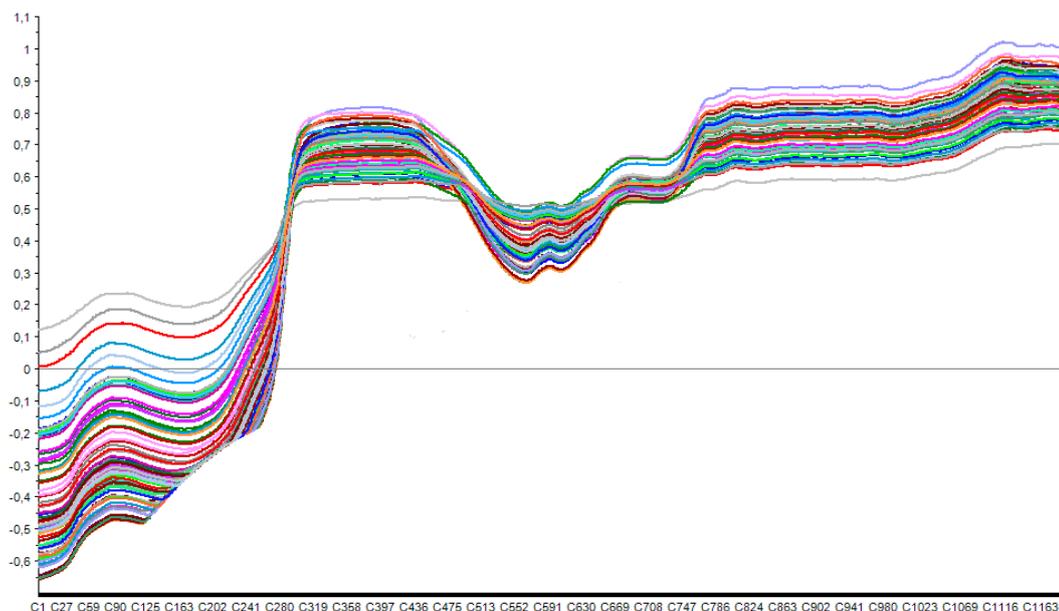


Figura 47- Espectros em bruto obtidos pelo equipamento NIR Luminar 5030.

Para modelar os espectros recorreu-se a várias ferramentas entre eles: corrigir a linha de base, a normalização, a derivadas de primeira e segunda ordem e para melhorar recorrer ao algoritmo de *Savitzky-Golay* que elimina ruídos espectrais, transformação da variação normal padrão (*SNV – Standard Normal Variate*) e correção multiplicativa de sinal (*MSC – Multiplicative Scatter Correction*).

É importante salientar que as derivadas permitem uma suavização dos desvios lineares da linha de base e problemas de sobreposição contudo diminui a relação sinal/ruído que poderá ser compensada com o alisamento *Savitzky-Golay* (Picó e Yolanda, 2014) e que o SNV e o MSC reduzem os problemas de dispersão da luz causada pela falta de homogeneidade das amostras este problema ocorre comumente nos equipamentos que efetuam as varreduras espectrais por refletância difusa e ainda mais importante tem-se verificado que esta ferramenta reduz o número de factores necessários (Naes *et al.*, 2004).

A figura nº 48 demonstra a modelação feita com o tratamento da linha de base. A figura nº 49 demonstra o aspeto dos espectros após a aplicação da primeira derivada acompanhada do algoritmo *Savitzky-Golay*.

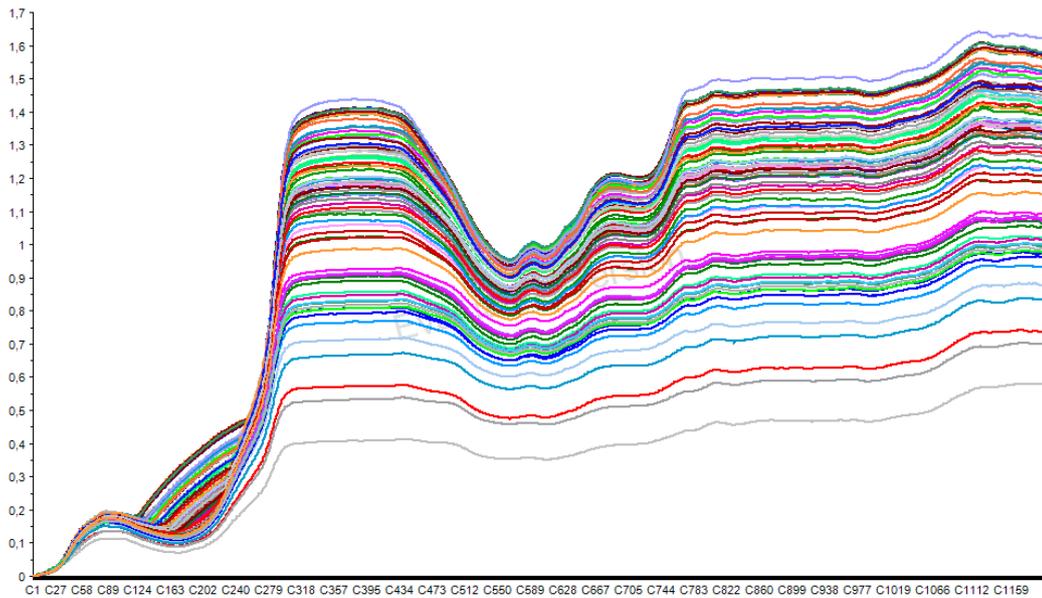


Figura 48- Os espectros iniciais sofreram o pré-tratamento da linha de base

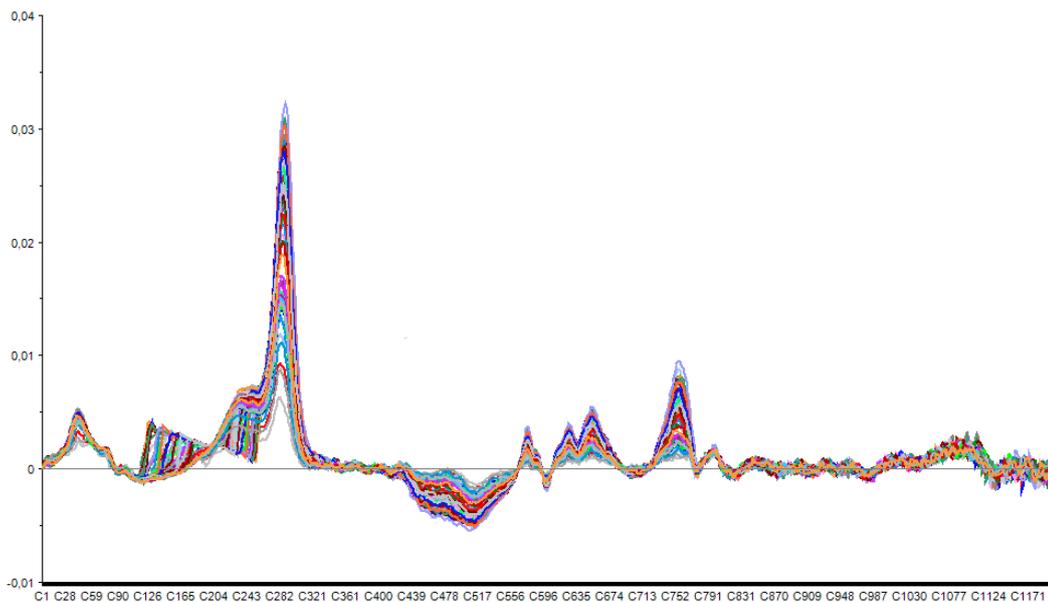


Figura 49- Espectros após primeira derivada com algoritmo de Savitzky-Golay

A derivada de primeira ou segunda ordem têm como objectivo dar um maior destaque aos picos, aumentando assim a sua resolução e eliminando efeitos aditivos, para além disso os métodos derivativos podem também eliminar interferências causadas pelo tamanho de partículas (Breton, 2000) A aplicação da primeira derivada neste caso removeu os efeitos aditivos de linha de base do espectro e evidenciou maioritariamente os picos pequenos, face a características com maior intensi-

dade, ou seja permitiu que esses picos se tornassem mais acentuados. Com base na figura dos espectros derivativos é possível observar que o pré-processamento empregado corrigiu o deslocamento de linha de base satisfatoriamente.

A variação normal padrão, SNV, foi a ferramenta utilizada nos espectros obtidos na figura nº 50. Este pré-processamento realiza um ajuste aditivo e multiplicativo (por uma constante ou fator de normalização) em que cada espectro é normalizado com base nos dados apenas daquele espectro, isto é não depende dos outros espectros a analisar. Esta normalização tem como objetivo reduzir a influência de variações indesejadas, como por exemplo a variação do percurso ótico, que se reflete no conjunto de dados, garantindo assim que cada espectro é representado de forma adequada e consistente (Giri, 2003).

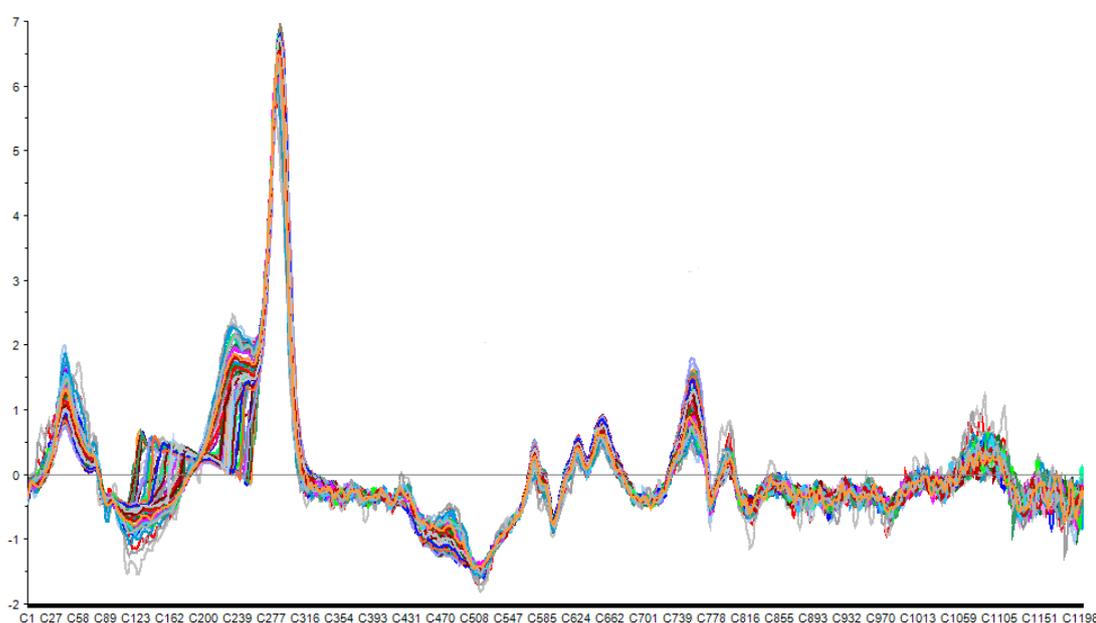


Figura 50 - Espectros obtidos após a aplicação da variação normal padrão (SNV)

O último método de pré-processamento foi o MSC (figura nº 51) que permitiu separar os efeitos físicos do espalhamento da luz dos efeitos químicos e físicos. (Giri, 2003)

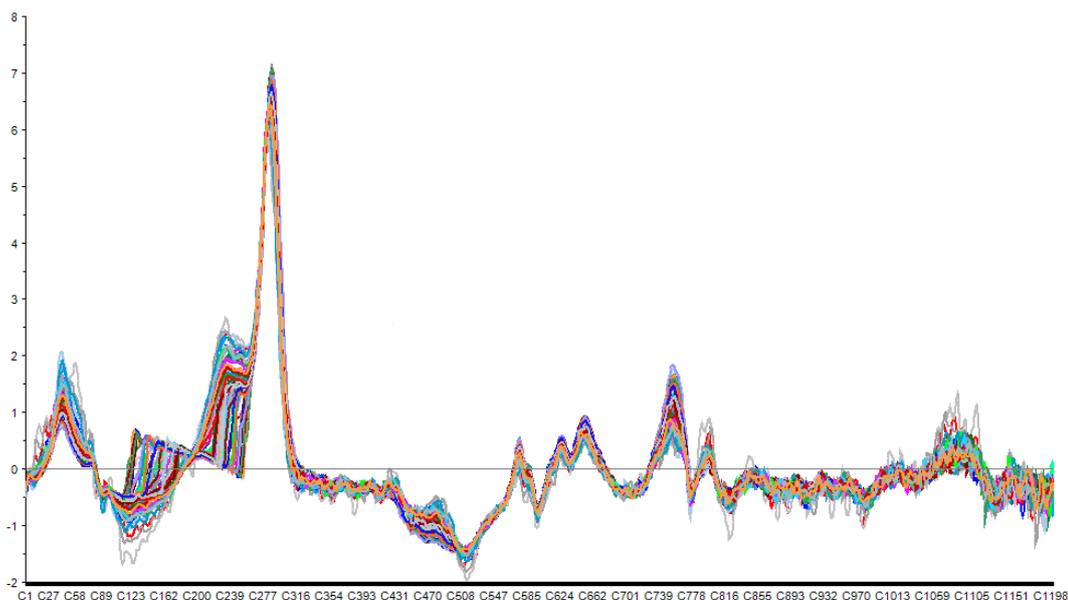


Figura 51 - Espectros obtidos após a aplicação da correção multiplicativa de sinal (MSC-EMSC)

Verificou-se que os algoritmos utilizados na correção do sinal, nas variações de linha de base e na normalização dos dados são necessários para remover as interferências originadas pela amostra, bem como pelo equipamento ou ambiente envolvente, conseguindo melhorar significativamente a análise quantitativa, aumentando a precisão. Em ambos os modelos não se verificou nenhuma amostra anómala, logo não existiu remoção de *outliers*.

Tendo em conta o observado anteriormente os modelos obtidos que obtiveram uma melhor correlação e menor erro RMSE foi os dados modelados através da derivada de primeira ordem com alisamento *Savitzky-Golay*, e por último o SNV e o MSC.

Para a construção de cada modelo separadamente fez-se corresponder a cada espectro o resultado obtido pelo método analítico de referência e optou-se por um método matemático utilizado para a construção de retas de calibração, com fundamentos multivariáveis, o PLS.

Após a seleção do pré-tratamento a aplicar ao conjunto de espectros, o próximo passo foi decidir sobre o número de componentes principais a ser utilizado na calibração. Para esta escolha o *software* facultou o gráfico X-PRESS a fim de evitar grandes ajustes dos dados, o número de factores do PLS foi estabelecido para se obter o valor mínimo da soma de previsão residual dos quadrados de erro (Cozzolino *et al.*, 2005) tendo este último valor variado consoante a matriz e o analito a quantificar, como se pode ver nas figuras nº 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 58, 59, 60, 61.

Obstou-se por não se colocar o gráfico X-PRESS (*Predicted Residual Sum Squared*) uma vez que devido ao elevado número de calibrações que se realizou optou-se apenas por demonstrar os gráficos finais da calibração. Contudo é importante salientar que este gráfico que derivou da soma dos quadrados dos erros de previsão residuais e permitiu observar o efeito do número necessário de componentes

principais, ou o número de factores na calibração. Ao se observar esse gráfico para as diferentes calibrações necessárias a escolha do número de componentes principais recaiu no último antes de se deixar observa variações significativas no gráfico, ou seja, a partir do qual o valor do X-PRESS começou a ser constante.

A selecção do número de factores é um ponto crucial na análise multivariada visto que se o número de factores escolhidos for baixo a calibração poderá conter pouca informação do espectro (*Underfitting*) enquanto que factores a mais poderá incluir ruído e variações sistemáticas (*Overfitting*) (Naes *et al.*, 2004).

A qualidade da calibração do método depende da linearidade, da precisão e da exatidão na previsão de amostras desconhecidas. A linearidade do método foi avaliada por um teste de regressão entre o método de NIR desenvolvido e o método de referência, na gama escolhida para o método. A precisão da previsão dos métodos foi obtida durante o desenvolvimento do método, onde se calculou a média global do erro de previsão.

Para avaliação do modelo tendo em conta a matriz vinho recorreu-se a uma validação externa apesar do tamanho da amostragem ser bastante pequeno também se realizou uma validação cruzada sem que sejam utilizadas amostras já utilizadas pela calibração de modo a não mascarar a fragilidade ou não do modelo de calibração. A validação externa transmite uma maior confiança do modelo obtido com poucas amostras, contudo por esta também conter um número bastante pequeno de amostras, existe a necessidade de acrescentar mais valores a este conjunto de amostras. Para o mosto apenas foi possível recorrer à validação cruzada, do tipo Random, visto que não existia a possibilidade de se obter mais amostras. O erro obtido pela validação é denominado por RMSEV (Root Mean Squared Error of Validation) ver equação nº 9. Um valor de RMSEV baixo refere que se esta perante um bom modelo. Neste estudo em ambos os modelos obtidos tanto para o mosto como para o vinho o valor de RMSEV foi baixo pelo que se pode concluir que o modelo PLS testado pode ser utilizado como modelo de calibração da espectrometria de infravermelho próximo.

Equação 8 - Erro da média do quadrado da calibração (RMSEC) e da validação (RMSEP)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i \text{ referência} - Y_i \text{ previsto})^2}{n - 1}}$$

onde n o número de amostras de calibração,  $y_i$  referência o valor de referência da amostra i e  $y_i$  previsto o valor previsto para a amostra i pelo modelo determinado.

De forma a ter em conta a fiabilidade do modelo segundo o valor de RPD (ver equação nº 10), foram determinadas em três categorias que se encontram descritas na tabela nº 29.

Equação 9 - Desvio Residual de Previsão

$$RPD = \frac{\text{Desvio Padrão do conjunto de validação}}{\text{RMSEP ou SEP}}$$

Tabela 29 - Interpretação do valor estatístico RPD

<i>(Chang et al., 2001)</i>		<i>(Dunn et al., 2002)</i>
$RPD > 2$	<b>Bons modelos</b>	$RPD > 2$
$1,4 < RPD < 2$	<b>Modelos aceitáveis</b>	$1,6 < RPD < 2$
$RPD < 1,4$	<b>Modelos não-confiáveis</b>	$RPD < 1,6$

O SEC e o SEP indicam ambos o valor do desvio médio das calibrações para o primeiro e para o segundo das previsões em relação aos valores do método de referência. Quanto menor for a distância, mais próximos serão os valores previstos pelo NIR e do método de referência, este valor dá a indicação se o método de análise por NIR é exato ou não, ou seja um menor erro implica uma maior precisão da calibração. Um modelo de calibração NIR robusto produzirá um SEC semelhante ao RMSEC e um SEP semelhante ao RMSECV do modelo de calibração NIR derivado. Sendo bons modelos aqueles que apresentem valores de SEC e SEP mínimos e ambos próximos.

Equação 10 – Erro padrão da calibração e previsão

$$SEC \text{ e } SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i \text{ referência} - Y_i \text{ previsto})^2}{n}}$$

onde n o número de amostras de calibração,  $y_i$  referência o valor de referência da amostra i e  $y_i$  previsto o valor previsto para a amostra i pelo modelo determinado.

O valor de BIAS é o desvio médio entre os valores preditos ( $y_i$ ) e os valores de referência ( $x_i$ ), na calibração. O BIAS avalia as diferenças sistemáticas entre os valores médios de o conjunto de calibração e o conjunto de validação. A precisão e exatidão da calibração podem ser medidas através da função estatística que se encontra de seguida:

Equação 11 - BIAS

$$BIAS = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i \text{ referência} - Y_i \text{ previsto})}{n}$$

Apenas foi calculado o valor de BIAS para a validação, uma vez que para a calibração pressupõem-se que por definição que será zero. O Bias dos espectros de validação devem ser o mais possível próximo de zero.

Para a determinação do cálcio em vinhos o modelo PLS obtido encontra-se na figura nº 52. Este modelo utilizou 7 fatores. Após a construção do modelo de calibração, é necessário testar a sua capacidade preditiva através de um novo conjunto de amostras que também foram analisadas pelo método de referência e pelo NIR. A quantidade de amostras do conjunto de validação deve corresponder a 1/3 do conjunto de calibração, contudo devido ao reduzido número de amostras para o mosto esta premissa não foi respeitada. Após a exportação dos espectros desse conjunto de amostras calculou-se a partir do modelo de calibração, o resultado (valor previsto) onde alguns desses valores podem ser encontrados na tabela nº 30.

Observou-se que ocorreu uma diminuição do RMSECV até o sexto fator, sendo que a partir desse fator o valor de erro de validação (RMSECV) não diminui pronunciadamente. Assim sendo os seis fatores parecem descrever satisfatoriamente o conjunto de dados, contudo optou-se pelos sete fatores devido ao melhor valor de correlação. Para a calibração o melhor valor de  $R_2$  de 0,9801 e para a validação de 0,9596 o que apresenta um modelo com boa linearidade e boa correlação. O valor de BIAS obtido foi baixo e o valor de RPD foi maior do que 2 e o valor de Q-value foi de 0,9512 pelo que uma vez mais se verifica que o modelo obtido apresenta ser um bom modelo e ajustado à gama de valores analisada. O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9800x + 3,2091$  e para a validação  $y = 0,8591x + 17,7853$

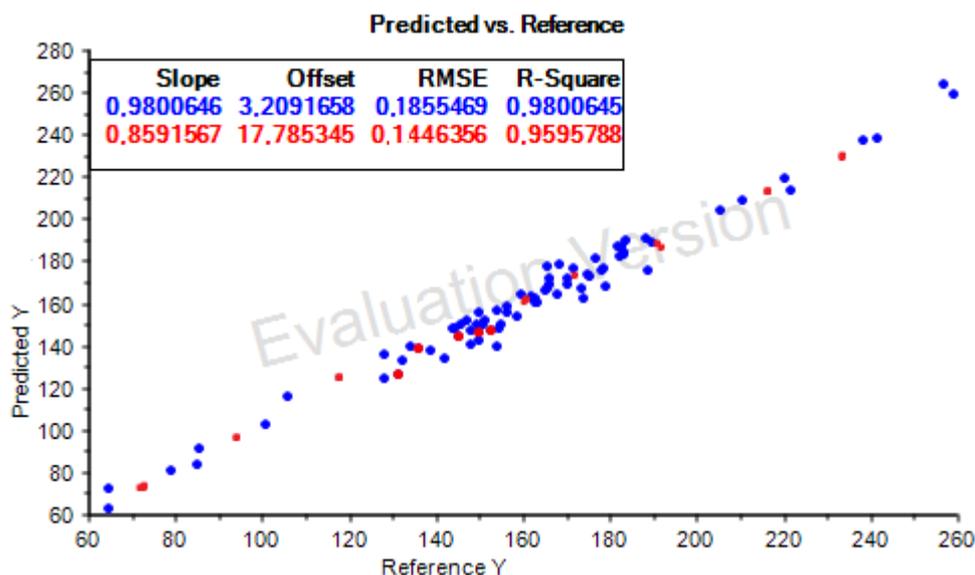


Figura 52 - Calibração do teor de cálcio para o vinho base

Tabela 30 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de cálcio para o vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	7
<i>RMSEC</i>	0,1856
<i>RMSEP</i>	0,1446
<i>SEC</i>	0,1756
<i>SEP</i>	0,1341
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9800
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0.9596
<i>RPD</i>	3,42
<i>BIAS</i>	0,0002
<i>Q-Value</i>	0,9512

Quando se comparou os resultados obtidos pelo método referência e os resultados obtidos pela calibração alcançada após a mesma ter sido validada através de uma validação externa, verificou-se que os valores são semelhantes e que não existe diferenças significativas. (tabela nº 31)

Tabela 31 - Comparação entre valores obtidos para o cálcio no vinho base

<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>
64,6657	65,895
84,8193	85,9357
147,9147	148,906
182,1917	181,4704
100,7043	99,0519
259,1043	259,9159
220,2677	219,2829
132,1837	132,7354
189,4753	188,4262
85,6807	86,0998

Para o mosto o modelo encontrado pode verificar-se na figura nº 53. Para este modelo foi necessário recorrer a nove fatores e o valor de RMSEC e RMSEP comparativamente com o valor obtido na matriz vinho foi maior. O valor de BIAS obtido foi mais alto, o valor de RPD mais baixo assim como o valor de Q-value (0,9120) contudo verifica-se que o modelo obtido foi bom ao se avaliar todo o conjunto de valores obtidos para validação e avaliação da qualidade do modelo (ver tabela nº32). Tal pode dever-se ao facto de a matriz vinho ser muito heterogénea e conter em suspensão partículas de pequenas e grandes dimensões. Não se realizou qualquer tipo de pré-tratamento ao mosto antes da obtenção do espectro NIR porque o objetivo era conseguir-se uma calibração que torna-se rápida e eficaz a medição do teor de cálcio no momento que o reboque chega à adega e se recolhe uma amostragem de uva e se obtém mosto para as análises de rotina para a entrada da uva na adega.

Para o modelo de calibração do teor de cálcio no mosto o erro será de 1,416 mg/L, enquanto que no vinho seria de 0,186 mg/L. O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9985x + 0,2394$  e para a validação  $y = 0,9478x + 8,6926$ .

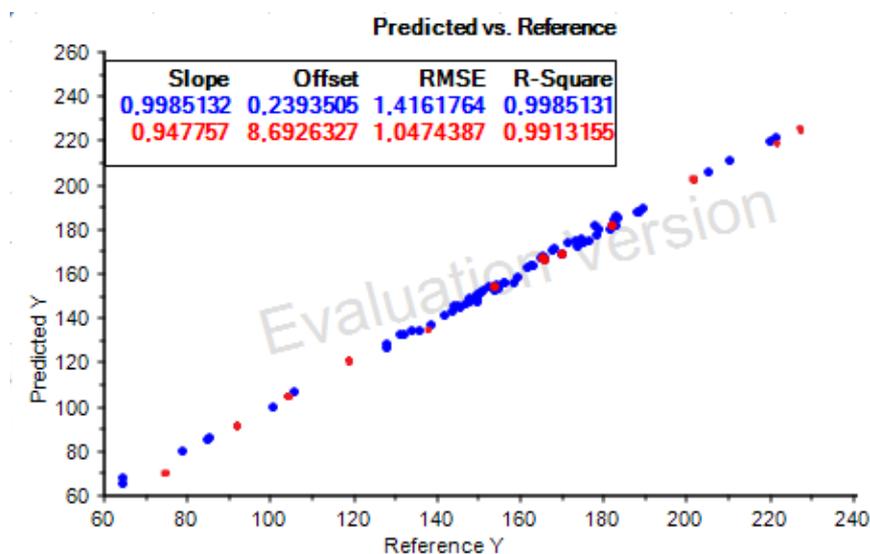


Figura 53 - Calibração do teor de cálcio para o mosto

Tabela 32 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de cálcio no mosto

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Número de fatores	9
RMSEC	1,4162
RMSEP	1,0474
SEC	1,1231
SEP	1,0153
$R^2$ calibração	0,9985
$R^2$ validação	0,9913
RPD	2,05
BIAS	0,0181
Q-value	0,9120

Apesar de no mosto se ter efetuado uma calibração interna os valores obtidos para o cálcio no mosto através da tecnologia NIR e por referência encontram-se na tabela nº 33. De acordo com os resultados obtidos, foram observadas diferenças negativas e diferenças positivas tanto nas calibrações efetuadas para o vinho como para o mosto, havendo, portanto, uma aleatoriedade nas diferenças entre os resultados de referência e os resultados obtidos por infravermelho próximo.

Tabela 33 - Comparação entre valores obtidos para o cálcio no mosto

<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>
64,6657	65,895
84,8193	85,9357
147,9147	148,906
182,1917	181,4704
100,7043	99,0519
259,1043	259,9159
220,2677	219,2829
132,1837	132,7354
189,4753	188,4262
85,6807	86,0998

É de salientar que as tabelas com a comparação dos resultados obtidos pela calibração alcançada e o método analítico de referência se encontram no Anexo 3. Para a calibração do teor de magnésio no vinho o modelo PLS conseguido encontra-se na figura nº 54. Para este elemento mineral conseguiu-se um  $R^2$  bastante elevado tanto para o modelo de calibração ( $R^2= 0,9989$ ) como para o modelo de validação ( $R^2= 0,9985$ ). O erro associado a este modelo foi de 0,504 mg/L e foram considerados sete fatores. Observou-se que o valor de RMSEC e de RMSEP para além de apresentarem valores abaixo de 1 são bastante próximos (ver tabela nº 34) o que indica que o modelo obtido aparente ser um bom modelo visto que o RMSEP refere-se à exactidão e precisão do método multivariado, uma vez que mede a diferença entre o valor real e o estimado pelo modelo. Para a calibração o melhor valor de  $R_2$  de 0,9801 e para a validação de 0,9596 o que apresenta um modelo com boa linearidade e boa correlação. O valor de BIAS obtido foi baixo e o valor de RPD foi maior do que 2 e o valor de Q-value foi acima dos 0,9 pelo que uma vez mais se verifica que o modelo obtido apresenta ser ajustado. O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9989x + 0,053$  e para a validação  $y = 0,9963x + 0,5156$

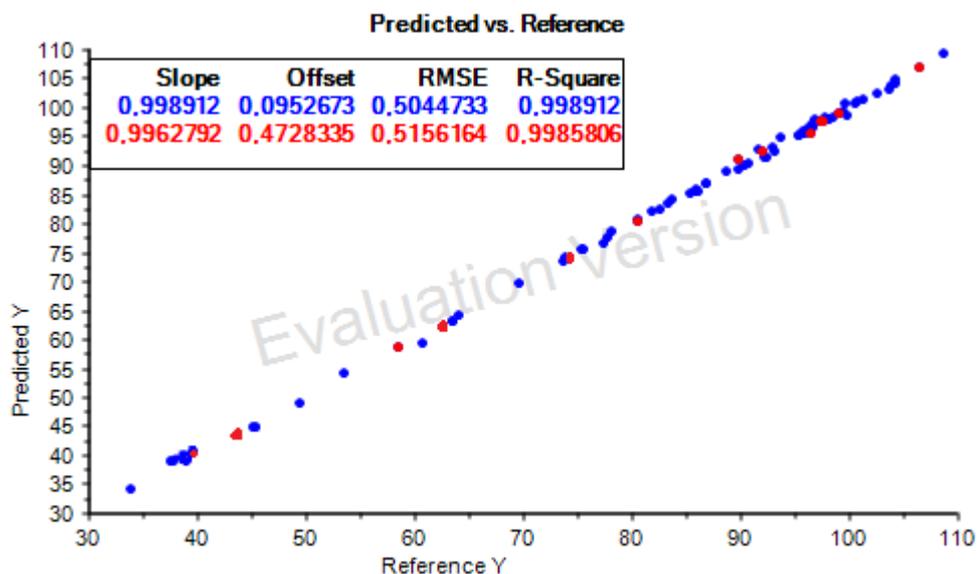


Figura 54 - Calibração do teor de magnésio para o vinho base

Tabela 34 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de magnésio no vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	7
<i>RMSEC</i>	0,5045
<i>RMSEP</i>	0,5156
<i>SEC</i>	0,5078
<i>SEP</i>	0,6003
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9989
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9986
<i>RPD</i>	3,71
<i>BIAS</i>	0,0347
<i>Q-value</i>	0,9012

No modelo obtido para a quantificação do magnésio no mosto (Figura nº 55) o valor de RMSEC e RMSEP obtidos foram o dobro do que para o vinho contudo ainda se considera ser um valor baixo e aceitável, pois representa um erro de 1,02 mg/L. Os valores do coeficiente de correlação obtidos para o modelo de calibração foi de 0,9956 e de 0,9893 para o modelo de validação também foram um pouco mais baixos que os valores obtidos para o vinho contudo continuaram a ser valores bastante altos demonstrando existir uma excelente correlação entre os resultados e uma boa linearidade relevando uma boa qualidade do modelo, outro fator que indica o modelo de calibração ser adequado é o valor de BIAS que foi baixo 0,0514 e o valor de Q-value que foi de 0,8869 contudo para o modelo de calibração teve-se em conta oito fatores para se obter este modelo (tabela nº 35). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9956x + 0,3875$  e para a validação  $y = 0,9971x + 0,2102$

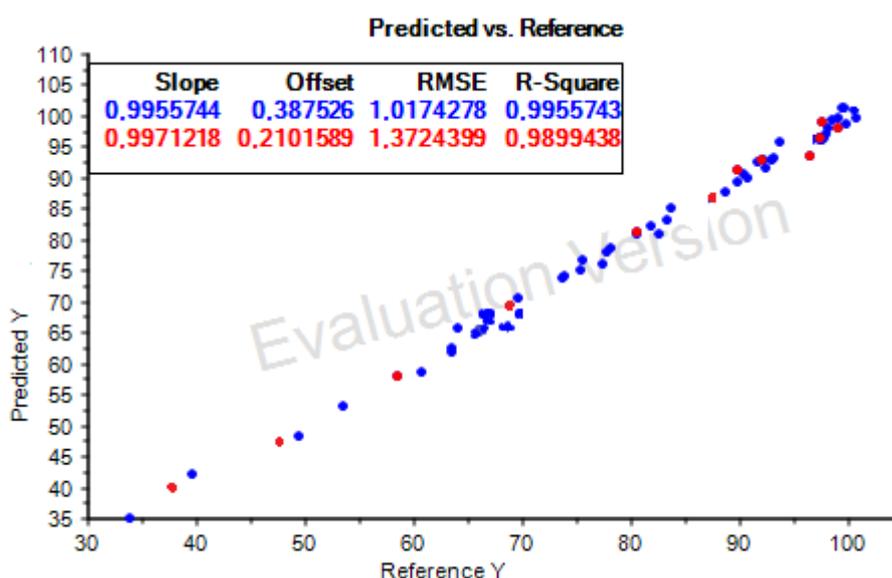


Figura 55 - Calibração do teor de magnésio para o mosto

Tabela 35 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de magnésio no mosto

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	8
<i>RMSEC</i>	1,0174
<i>RMSEP</i>	1,3724
<i>SEC</i>	1,0242
<i>SEP</i>	1,4547
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9956
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9893
<i>RPD</i>	2,01
<i>BIAS</i>	0,0514
<i>Q-value</i>	0,8869

A figura nº 56 demonstra o modelo PLS, com cinco factores, obtido para a determinação do potássio no vinho. Uma vez mais foi obtido um bom modelo de calibração com um valor de RMSEC e RMSEP um pouco mais elevados que os anteriores modelos contudo estes valores continuam, ainda que menos do que os modelos anteriores, próximos entre si, o que demonstra que o modelo apresenta uma certa consistência. Tendo em conta os elevados teores em que o potássio se encontra no vinho, apesar de o erro ser maior do que os anteriores 3,69 mg/L dentro de uma gama de 500-900 mg/L não apresenta um erro muito significativo. O valor de BIAS obtido foi baixo, o valor de RPD foi maior do que 2 e o valor de Q-value foi de 0,9695 pelo que uma vez mais se verifica que o modelo obtido apresenta ser ajustado e coerente (ver tabela nº 36). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9972x + 2,1934$  e para a validação  $y = 0,9969x + 2,4382$

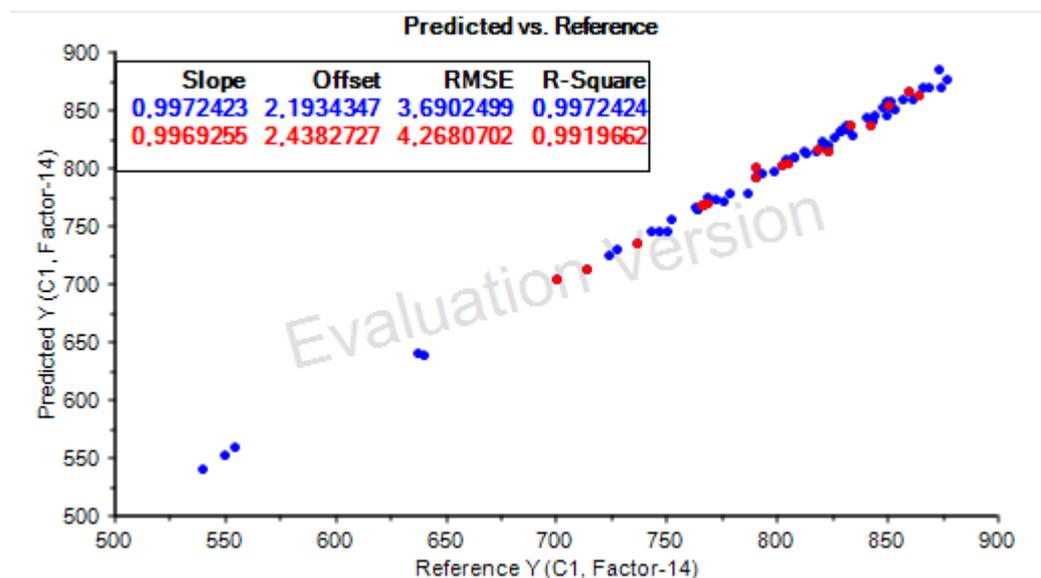


Figura 56- Calibração do teor de potássio no vinho base

Tabela 36 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de potássio no vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	5
<i>RMSEC</i>	3,6902
<i>RMSEV</i>	4,2680
<i>SEC</i>	3,6848
<i>SEP</i>	4,2594
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9972
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9920
<i>RPD</i>	3,97
<i>BIAS</i>	0,0094
<i>Q-value</i>	0,9695

O modelo de calibração para o teor de potássio no mosto, foi obtido tendo em conta oito factores, e pode observar-se na figura nº 57. Apesar de se ter obtido um excelente coeficiente de variação ( $R^2=0.983$ ) o erro para esta calibração foi de 9,091 mg/L., contudo tal como foi referido anteriormente tendo em conta que a gama de concentração deste elemento ser bastante elevada o erro de cerca de 9 mg/mL poderá não causar um impacto negativo na hora de tomar decisões quanto aos processos de vinificação a realizar. Este erro também poderá estar associado as várias diluições que tiveram de ser realizadas para que a amostra se encontra-se dentro da gama de leitura do EAA. Os valores de RMSEC e RMSEP não se encontram próximos o que pode estar ligado com o fato de as amostras utilizadas na validação não serem representativas de toda a gama utilizada na validação. O valor de BIAS obtido foi mais alto e o valor de RPD mais baixo do que dois mas superior a 1,6 o que indica um modelo aceitável e o valor de Q-value foi de 0,9218 o que demonstra a boa qualidade do modelo (ver tabela nº 37). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9833x + 13,3116$  e para a validação  $y = 0,9894x + 5,6389$ .

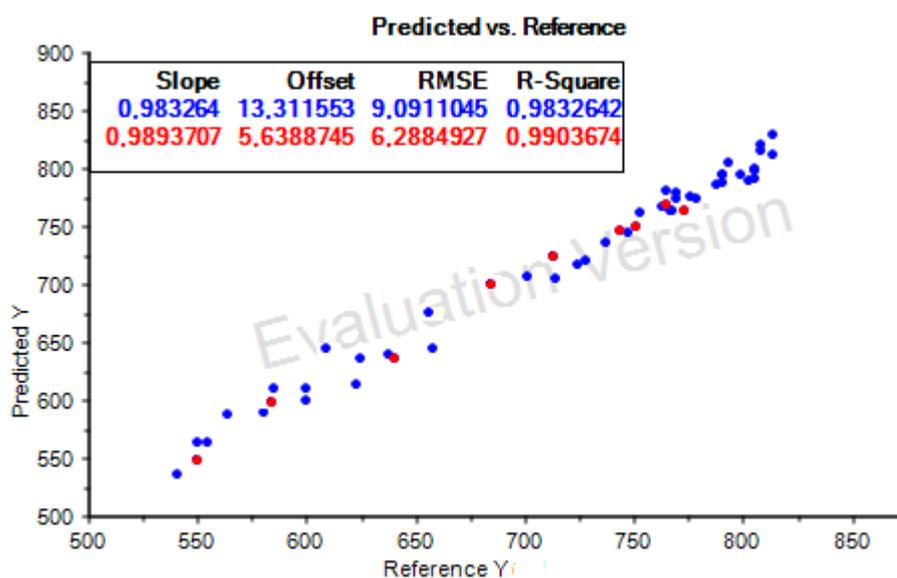


Figura 57 - Calibração do teor de potássio no mosto

Tabela 37- - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de potássio no mosto

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Número de fatores	8
RMSEC	9,0911
RMSEV	6,2885
SEC	9,1515
SEP	6,1573
R <sup>2</sup> calibração	0,9833
R <sup>2</sup> validação	0,9901
RPD	1,99
BIAS	0,0743
Q-value	0,9218

Para a calibração do teor de azoto no vinho o modelo PLS alcançado (Figura nº 58) apresentou um coeficiente de correlação elevado ( $R^2 = 0,9977$ ) assim como para a validação ( $R^2 = 0,9987$ ) e uma boa linearidade tendo-se apenas em conta a utilização de cinco factores. Como o valor de RPD ao ser superior de 2 pressupõem-se ter-se obtido um bom modelo devido ao baixo valor de BIAS (0,1101) e a um valor de Q-value superior a 0,97 (tabela nº 38). O erro para este modelo de calibração foi de 0,3793 mg/L o que tendo em conta a gama de valores do teor de azoto dentro do vinho é aceitável, para além disso o valor de RMSEC e RMSEP encontram-se próximos o que indica um modelo consistente. O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9977x + 0,3793$  e para a validação  $y = 0,9963x + 0,4485$ .

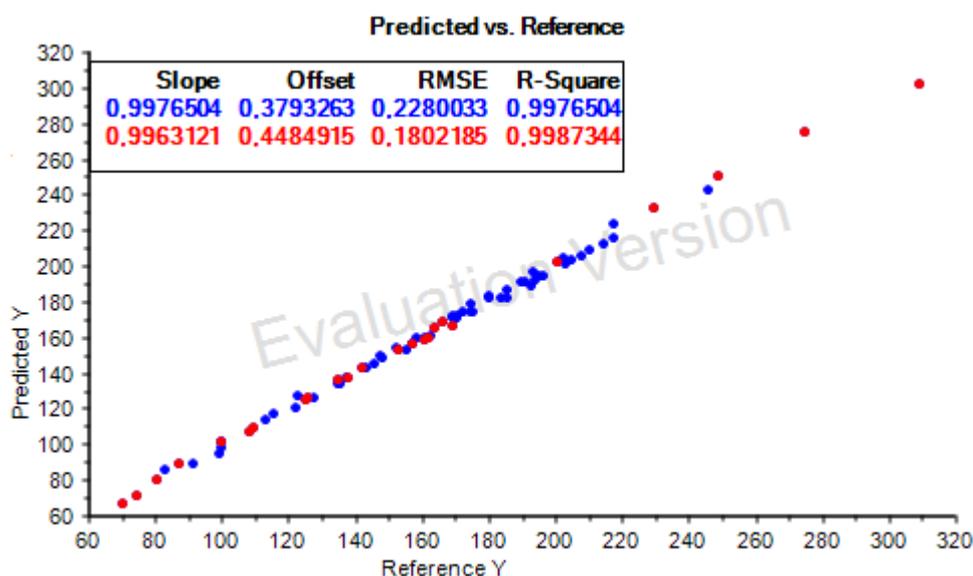


Figura 58 - Calibração do teor de azoto no vinho base

Tabela 38 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de azoto no vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	5
<i>RMSEC</i>	0,2280
<i>RMSEV</i>	0,1802
<i>SEC</i>	0,2098
<i>SEP</i>	0,1700
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9977
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9987
<i>RPD</i>	2,51
<i>BIAS</i>	0,0087
<i>Q-value</i>	0,9789

O modelo de calibração conseguido para o teor de azoto no mosto (figura nº 59) foi obtido com seis fatores e uma vez mais verificou-se que o erro associado ao analito na matriz mosto é sempre superior ao obtido na matriz vinho, (no vinho 0,228 g/L enquanto que no mosto 1,563 g/L). Contudo o coeficiente de variação continua alto tal como nas calibrações anteriores tendo-se neste caso em conta sete factores e como foi obtido um valor de BIAS baixo (0,0093) e um valor de Q-value cerca dos 0,91 pode-se afirmar que o modelo obtido apresenta ser um bom modelo (Tabela nº 39). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9988x + 0,1867$  e para a validação  $y = 0,9961x + 0,6149$ .

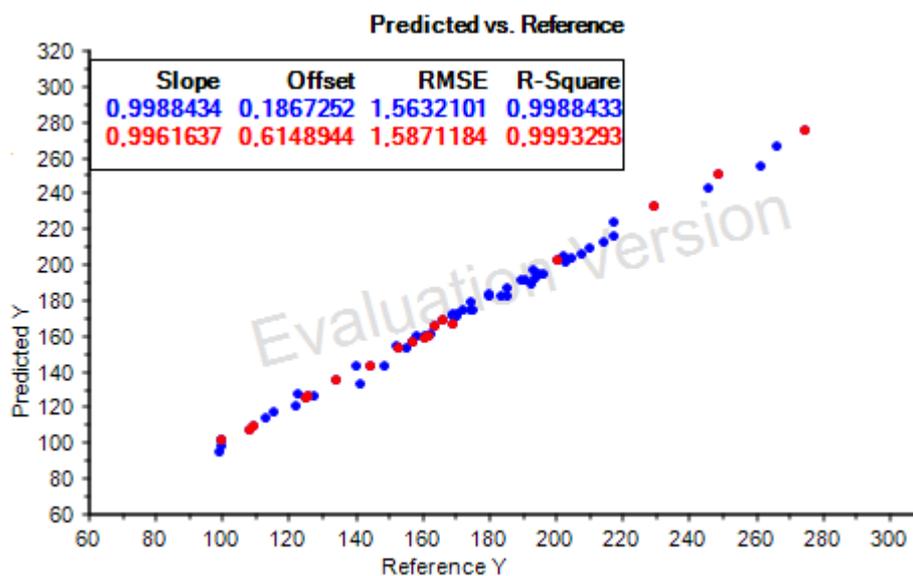


Figura 59 - Calibração do teor de azoto no mosto

Tabela 39 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de azoto no mosto

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	6
<i>RMSEC</i>	1,5632
<i>RMSEV</i>	1,5871
<i>SEC</i>	1,5536
<i>SEP</i>	1,419
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9988
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9993
<i>RPD</i>	1,98
<i>BIAS</i>	0,0093
<i>Q-value</i>	0,9105

Para o modelo de calibração do teor de proteína no vinho recorreu-se ao modelo PLS com cinco factores tendo-se obtido o modelo descrito na figura nº 60. Neste modelo o coeficiente de variação obtido para a calibração foi de 0,9863 e para a validação foi de 0,9853 apresentando uma excelente correlação entre os valores de referência e do NIR e uma boa linearidade. O erro esperado para este modelo de calibração foi de 0,034 g/L. Devido ao baixo valor de SEC e SEP o modelo apresenta ser preciso e o baixo valor de BIAS demonstra ser um modelo exato, sendo que o valor de Q-value (0,9812) aponta para a presença de um bom modelo de calibração. O valor de RPD superior a 2 sugere um bom modelo de calibração (tabela nº 40). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9863x + 0,0137$  e para a validação  $y = 0,9517x + 0,0396$ .

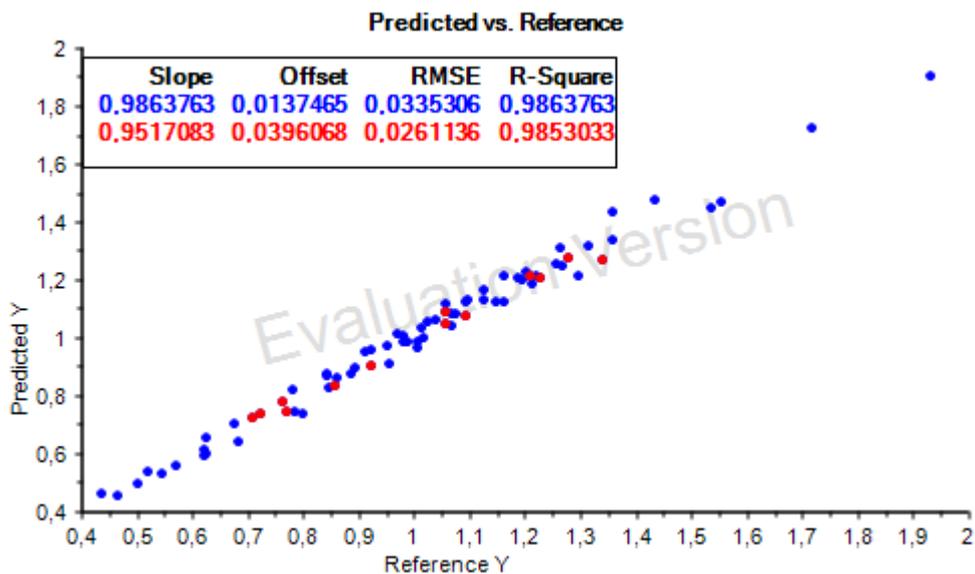


Figura 60- Calibração do teor de proteína no vinho base

Tabela 40- - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de proteína no vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	5
<i>RMSEC</i>	0,0261
<i>RMSEV</i>	0,0335
<i>SEC</i>	0,0256
<i>SEP</i>	0,0333
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9882
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9863
<i>RPD</i>	3,42
<i>BIAS</i>	0,0002
<i>Q-value</i>	0,9812

Tendo em conta a quantificação do teor de proteína no mosto o modelo de calibração selecionado (Figura nº 61) apresenta um erro de 0,055 mg/L e um coeficiente de correlação de 0,9437 tendo em conta apenas seis factores. Este modelo apresentou uma boa correlação entre os valores reais e os valores preditos assim como uma boa linearidade. Devido ao baixo valor de SEC e SEP o modelo apresenta ser preciso, o baixo valor de BIAS demonstra um modelo exato e o valor de Q-value (0,9199) pressupõem que se obteve um modelo de boa qualidade (Tabela nº 41). O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9437x + 0,0454$  e para a validação  $y = 0,9117x + 0,0652$  e em ambos os casos o valor de  $R_2$  foi ligeiramente inferior ao obtido no vinho o que poderá dever-se ao fato de a proteína no mosto se encontrar em menor concentração e ao fato de esta amostra ser bastante heterogénea dificultando a dispersão da luz infravermelha por todo o liquido de igual forma.

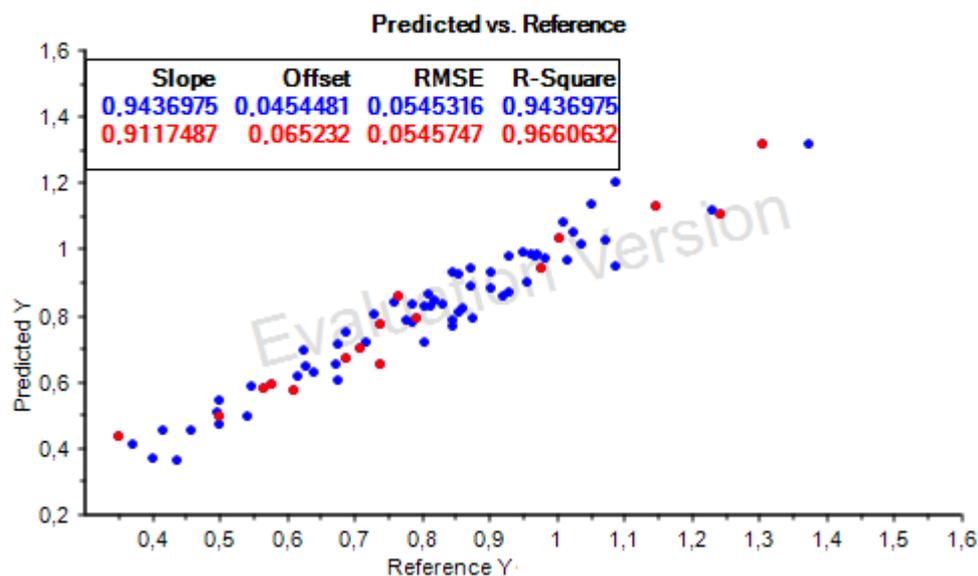


Figura 61 – Calibração do teor de proteína no mosto

Tabela 41 - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração do teor de proteína no mosto

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	6
<i>RMSEC</i>	0,0545
<i>RMSEV</i>	0,0546
<i>SEC</i>	0,0549
<i>SEP</i>	0,0560
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9437
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9700
<i>RPD</i>	1,88
<i>BIAS</i>	0,0002
<i>Q-value</i>	0,9199

Para a calibração da turbidez do vinho o modelo conseguido encontra-se na figura nº 62 O método de referência para a avaliação deste parâmetro já é um método rápido e simples, pelo que o único objetivo de se ter realizado este modelo foi para que no final todas as calibrações possam ser inseridas no Luminar 5030 e que através de uma única análise se consiga obter todos os parâmetros estudados e a turbidez é um parâmetro a ter em conta no estudo das precipitações e instabilidade do vinho. O modelo de calibração obtido foi  $y = 0,9995x + 0,01624$  e para a validação  $y = 0,9830x + 0,6044$  e ambos apresentaram uma alta correlação 0,9995 e 0,9992 respetivamente assim como uma boa linearidade e um elevado valor de RPD o que indica um bom modelo de calibração assim como um valor de Q-value elevado cerca de 0,96 o que prediz que o modelo obtido é de qualidade (tabela nº 42).

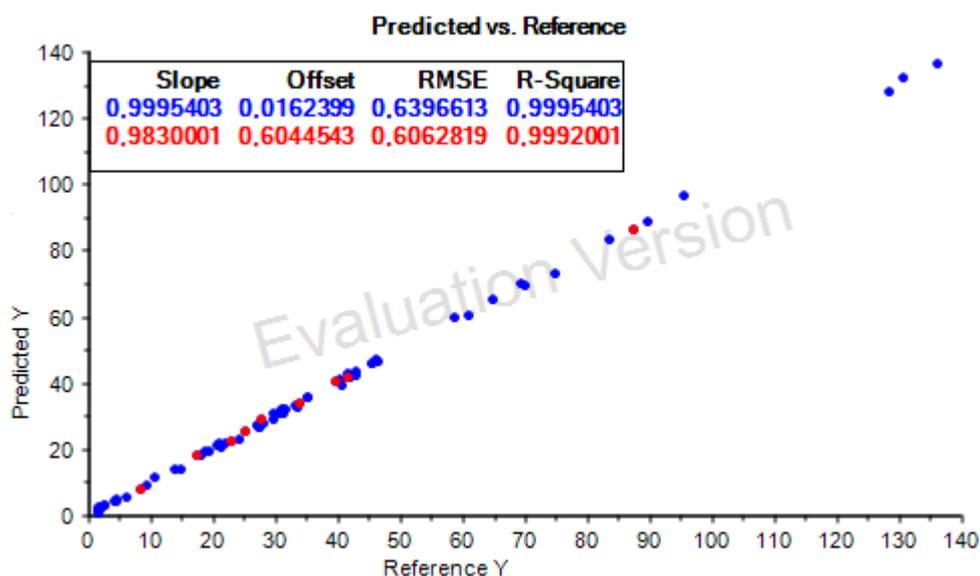


Figura 62- Calibração para avaliação da turbidez no vinho base

Tabela 42- - Parâmetros considerados na avaliação e validação da Calibração da turbidez no vinho base

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Número de fatores</i>	4
<i>RMSEC</i>	0,6397
<i>RMSEV</i>	0,6063
<i>SEC</i>	0,6340
<i>SEP</i>	0,6454
<i>R<sup>2</sup> calibração</i>	0,9996
<i>R<sup>2</sup> validação</i>	0,9994
<i>RPD</i>	4,01
<i>BIAS</i>	0,0090
<i>Q-value</i>	0,9569

Segundo vários autores as regiões dos espectros NIR para o estudo das proteínas estão associadas principalmente às ligações N-H das aminas (1.580 – 1495) (Nousiainen *et al.*, 2004) como essa zona se encontra bem definida nos espectros obtidos pode ser um dos motivos pelos quais a determinação de azoto e proteína foi dos modelos com a utilização de menos factores definidos e com menor erro associado ao modelo.

O número de factores utilizado no PLS para cada elemento por vezes foi alto isto pode estar correlacionado com o facto de a espectroscopia de infravermelho ter em conta os comprimentos de onda onde os grupos relacionados com as proteínas e os hidratos de carbono que se encontrem ligados a elementos minerais em vez de as vibrações específicas relacionadas apenas com o elemento mineral, não sendo assim o ruído a única causa da variabilidade do número de factores (Guardia e Garrigues, 2015; Mir-Marqués *et al.*, 2016).

A validação externa foi realizada para se poder testar o modelo de calibração contra um conjunto de dados diferentes das amostras utilizadas na calibração que não foram usadas para gerar o método de calibração, contudo devido ao baixíssimo número de dados utilizados para a validação externa é necessário no futuro adicionar mais amostras nesta validação para que os resultados estatísticos possam ser considerados, pelo que os resultados obtidos para as validações externas não são apresentadas neste trabalho.

Tabela 43 - Resultados obtidos pela calibração e validação dos minerais estudados, do teor de proteína e da turbidez.

Vinho				
Parâmetro		Reta	RMSE	R <sup>2</sup>
Cálcio	Calibração	$Y = 0,9800x + 3,2091$	0,186	0,98
	Validação	$Y = 0,8591x + 17,7853$	0,145	0,96
Magnésio	Calibração	$Y = 0,9989x + 0,053$	0,504	0,999
	Validação	$Y = 0,9963x + 0,5156$	0,516	0,999
Potássio	Calibração	$Y = 0,9972x + 2,1934$	3,69	0,997
	Validação	$Y = 0,9969x + 2,4382$	4,268	0,992
Azoto	Calibração	$Y = 0,997x + 0,3793$	0,228	0,998
	Validação	$Y = 0,9963x + 0,4485$	0,1802	0,998
Proteína	Calibração	$Y = 0,9863x + 0,0137$	0,033	0,986
	Validação	$Y = 0,9517x + 0,0396$	0,026	0,985
Turbidez	Calibração	$Y = 0,9995x + 0,01624$	0,639	0,999
	Validação	$Y = 0,9830x + 0,6044$	0,606	0,999

Tabela 44 - Resultados obtidos pela calibração e validação dos minerais estudados, do teor de proteína e da turbidez.

Mosto				
Parâmetro		Reta	RMSE	R <sup>2</sup>
Cálcio	Calibração	$Y = 0,9985x + 0,2394$	1,416	0,999
	Validação	$Y = 0,9478x + 0,6926$	1,047	0,991
Magnésio	Calibração	$Y = 0,9956x + 0,3875$	1,017	0,996
	Validação	$Y = 0,9971x + 0,2102$	1,372	0,989
Potássio	Calibração	$Y = 0,9833x + 13,3116$	9,091	0,983
	Validação	$Y = 0,9894x + 5,6389$	6,288	0,990
Azoto	Calibração	$Y = 0,9988x + 0,1867$	1,563	0,998
	Validação	$Y = 0,9961x + 0,6149$	1,587	0,999
Proteína	Calibração	$Y = 0,9437x + 0,0454$	0,054	0,943
	Validação	$Y = 0,9117x + 0,0652$	0,054	0,966



---

*V Capítulo*

*Conclusão*

---





## V- Conclusão

Na indústria alimentar, a conformidade com as normas legais, bem como a demanda por produtos de alta qualidade, exigem um acompanhamento atento do produto ao longo de todo o processo de produção.

A necessidade de produzir cada vez melhor e de forma sustentável, é um grande desafio para os técnicos e produtores. Tudo começa com o uso eficiente dos recursos naturais como terra, água assim como fertilizantes e produtos fitofármacos. Para que tal seja possível é necessário ter em conta as necessidades nutricionais da cultura, a taxa de absorção de nutrientes e fertilidade atual do solo. A determinação da fertilidade atual do solo é de fundamental importância uma vez que terá influência na qualidade de todo o processo produtivo.

Ao se analisar a uva ter-se-á a composição real da matéria-prima que irá produzir o vinho espumante. Esta análise é importante na medida que no futuro as uvas ao chegarem a adega poderão ser separadas consoante o talhão de origem de forma a evitar produzir vinho com elevados teores minerais que trarão problemas durante a fermentação em garrafa ou até mesmo depois de estar engarrafado ocorrer a formação de precipitados e cristais. Ao ser no futuro possível fazer esta seleção criteriosa poder-se-á poupar algumas centenas de euros ao se deixar de realizar uma nova filtração do vinho base e no caso de o mesmo já se encontrar engarrafado poupar-se-á em novas garrafas, rótulos e rolhas.

As concentrações de cálcio, magnésio, e potássio estão entre as análises mais comuns em laboratórios de controlo de vinho. A sua presença não afeta apenas algumas etapas de produção como o processo de fermentação e/ou armazenamento), mas também a estabilidade do produto final muitas vezes já engarrafado, o que acarreta grandes custos para a empresa. Tal como Quelhas (2011), Ribéreau-Gayon *et al.* (2006b) e Pereira *et al.* (2008) verificou os elevados teores de cationes, bem como altos valores de pH do solo contribuíram para a rápida evolução química dos produtos elaborados.

O potássio, o cálcio e o magnésio são constituintes naturais da uva (Álvarez *et al.*, 2012) onde o potássio é o elemento predominante no mosto da *Vitis vinífera* (Frias *et al.*, 2001; Marengo e Aceto, 2003), tal como se observou neste estudo, contudo a sua concentração, em conjunto com a do cálcio, é alterada devido a precipitações que podem ocorrer no vinho durante a sua estabilização e envelhecimento, ocorrendo a formação de cristais de bitartarato de potássio e tartarato de cálcio (Correa e Polo, 1990; Lara *et al.*, 2005; Lasanta, 2012; Portela, Roboredo e Louzada, 2003). O potássio interfere na acidez do vinho através da salificação do ácido tartárico. A concentração de potássio está relacionada principalmente com as práticas culturais da vinha, com o grau de maturação da uva e à forma de extração do mosto. O cálcio e o magnésio para além de virem do solo também podem estar relacionados com tratamentos fitossanitários à vinha, como por exemplo a calda bordalesa. (Meneguzzo *et al.*, 2006)

É importante ter em conta que a origem dos minerais no vinho pode ser dupla. A origem primária faz referência aos minerais que provêm do solo e a origem secundária está associada a impurezas externas, derivadas do processo de vinificação (desde a colheita até ao engarrafamento) (Kment *et al.*, 2005). Ter conhecimento do teor mineral do mosto é fundamental durante a vinificação e posteriormente no vinho pois estes terão um papel importante no sabor, gosto, cor e estabilidade a longo prazo de produtos finais (Brescia *et al.*, 2002; Sauvage *et al.*, 2002). Desta forma, verificou-se que é importante ter conhecimento do conteúdo mineral do mosto para que seja possível antecipar o problema de altos teores de determinados minerais e assim antecipar problemas de agregações minerais e precipitações de forma a não afetar a qualidade do vinho.

Para se poder calibrar um aparelho de infravermelho próximo de forma a que o valor se aproxime o mais possível da realidade é necessário que os valores que se obteve do método de referência correspondam à realidade da amostra que deu origem ao espectro de infravermelho próximo. Neste trabalho comparou-se duas metodologias para a análise de minerais por espectrometria de absorção atômica, a primeira foi realizada tal como descrita pela OIV a leitura diretamente no vinho e outra com um pré-tratamento da amostra, ou seja a leitura da digestão ácida do vinho e não a leitura direta do vinho. Como se conseguiu observar através das figuras 41, 42 e 43 as concentrações de minerais obtidas pela leitura do vinho diretamente foram sempre inferiores à leitura da digestão ácida do vinho. Raras exceções aconteceram ao contrário que podem ser explicadas por perda de cinza durante o pré-tratamento da amostra.

Estes resultados podem derivarem do facto de após algumas leituras no vinho diretamente a chama da espectrometria de absorção atômica deixava de ser uniforme devido aos resíduos (como o açúcar do vinho) que iam ficando na fenda do atomizador deixando a chama de ser constante e alterando assim o valor de absorvância lido pela lâmpada de cátodo oco. Através das figuras 41, 42 e 43 também é possível observar que na leitura do potássio a diferença entre leituras não é tão grande isto poderá ser explicado pelo facto de vinho para a leitura do potássio se encontrava mais diluído (uma vez que este mineral se encontra em grande quantidade no vinho) e assim deixou-se de se verificar o atomizador com tantos resíduos como para o cálcio e o magnésio não tendo sido necessário tantas paragens durante as leituras para limpar o atomizador.

De forma a garantir inequivocamente a veracidade do valor obtido pelo método de referência é necessário validar esse mesmo método de aí se ter estudado algumas figuras de mérito como, a precisão e a exatidão do método. A precisão permitiu descrever a reprodutibilidade dos valores obtidos pelo método visto depender da proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma da mesma amostra. Assim sendo foi possível verificar a precisão através do desvio-padrão, da variância e do coeficiente de variação que permitiram calcular o desvio em relação à média, tudo medidas de dispersão que permitem a análise da disseminação dos dados. Pelo que se pode verificar a espectrometria de absorção atômica apresenta ser precisa visto que foi observado um baixo desvio padrão e coeficiente de variação, o mesmo se pode afirmar para a determinação do azoto e proteína pelo método *kjeldahl*. Enquanto que a exatidão já dependeu da proximidade do

valor medido com o valor definido como verdadeiro e pelo que se pode verificar todas as metodologias utilizadas para a quantificação dos cátions foram exatas, assim como a determinação do teor azoto/proteína. A exatidão e a precisão do método constituem parâmetros que terão de ser sempre estudados, independente do seu propósito, exceto para métodos cujo o objetivo seja apenas qualitativo.

Os testes de adição e recuperação, assim como as figuras de mérito avaliadas, indicam que a precisão e exatidão do método proposto são suficientes para atender aos requisitos para o controlo de qualidade e para calibração da espectrometria de infravermelho próximo pelo que seria de esperar que caso a gama de comprimento de onda em estudo (700- 2300 nm) corresponda a uma boa gama para estudar o teor de minerais o método proposto seria uma boa alternativa para a determinação de cálcio, potássio e magnésio no mosto e vinho.

A estimativa dos elementos minerais por espectroscopia de infravermelho próximo dependeu da presença destes elementos em misturas com compostos orgânicos ou hidratados e outros sais (cátions e aniões) (Cozzolino *et al.*, 2008). Embora tenha sido utilizado um pequeno número de vinhos e mosto neste estudo, os dados preliminares indicaram que a espectrometria de infravermelho próximo (NIR) pode indicar ser um método adequado e rápido para a análise de alguns minerais tanto no vinho branco como no mosto. Observou-se ainda a presença de picos de absorção nos pontos de 1.450 nm e 1.750 nm, aproximadamente que representa a água visto que os comprimentos de onda a 1.450nm e entre 1.900nm a 2.000nm são regiões espectrais que se verificam devido à presença do grupo OH- ou de moléculas de água, enquanto que na região dos 1.750 nm observou-se um pequeno pico de absorção onde se verifica a absorção do grupo OH- podendo indicar a presença de álcoois e ácidos orgânicos, constituintes encontrados em grande quantidade em amostras de vinhos (Pedrosa, Menses e Carmelo, 2010) o que é uma boa indicação de que outros compostos poderão ser determinados por espectrometria de infravermelho próximo.

Com este estudo verificou-se que a tecnologia NIR ajuda a eliminar erros associados ao operador, isto porque praticamente não existe qualquer tipo de preparação da amostra antes de poder ser analisada já nos métodos de referência existe quase sempre um pré-tratamento da amostra. Outra vantagem desta tecnologia confirmada foi relativamente ao custo associado a cada análise assim como a facilidade de determinar vários parâmetros com elevada rapidez e precisão, não esquecendo que é uma técnica mais amiga do ambiente porque não produz resíduos tóxicos.

O desenvolvimento destes modelos de calibração irá permitir o acompanhamento de mais um parâmetro de qualidade na produção do espumante no caso da determinação do cálcio. Relativamente às análises realizadas no produto terminado, estes modelos irão permitir a quantificação de praticamente todos os parâmetros físico-químicos analisados em rotina, e dispensar no dia-a-dia a maioria dos métodos de referência morosos e dispendiosos. Sendo que estes métodos poderão passar a ser apenas utilizados para validar os resultados obtidos pela tecnologia NIR assim como para aumentar o grupo de calibração e assim aumentar a gama de análise e para o estudo de novas amostras,

matrizes. Este facto poderá representar um elevado desenvolvimento no controlo de qualidade para a empresa que o utilize, uma vez que se trata de um método eficaz e inovador.

Os métodos desenvolvidos requerem manutenção e atualização, contudo após a adição de novas amostras ao conjunto de calibração, é necessário que se execute de novo o processo de validação do modelo de calibração. A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Com a validação do modelo é possível ter conhecimento sobre as limitações do método e confiabilidade nos valores obtidos nas análises efetuadas pela espectrometria de infravermelho próximo.

A análise multivariada demonstrou ser uma boa ferramenta para a decomposição da informação proveniente dos espectros obtidos das amostras de vinhos e mosto, onde foram avaliadas alguns parâmetros físico-químicos. A análise visual dos espectros é importante para a deteção inicial de padrões subjacentes aos dados o que é uma ferramenta muito importante visto contribuir para a interpretação e racionalização da informação conduzindo à criação de modelos de previsão e à possibilidade de desenvolvimento de estratégias de pré-tratamento dos dados ajustadas.

Verificou-se que os algoritmos utilizados na correção de sinal, nas variações de linha de base e na normalização dos dados foram necessários para remover as interferências originadas pela amostra (matriz), bem como pelo equipamento ou ambiente envolvente, conseguindo melhorar significativamente a análise quantitativa, aumentando a precisão do método e diminuindo o erro associado.

Com tudo o que foi exposto observou-se que o método selecionado a espectrometria de infravermelho próximo, apesar de ser um método rápido, representa um compromisso entre a exatidão requerida, o tempo e os recursos disponíveis para a análise que se necessita.

Conclui-se que a espectroscopia de infravermelho próximo, associada às técnicas de quimiometria, permitem a construção de modelos de calibração capazes de quantificarem as propriedades físico-químicas estudadas para o vinho base branco e mosto. Ou seja determinação do teor de cálcio, potássio, magnésio, azoto, proteína e avaliação da turbidez pode ser realizada com boa precisão e exactidão. Contudo é importante salientar que apenas foi realizada a calibração para a turbidez de forma ser possível através de uma única leitura se obter todos os parâmetros analisados e não para se substituir por um método mais rápido uma vez que o turbidímetro é um método também bastante rápido e mais barato que a espectrometria de infravermelho próximo.

Embora os nossos resultados sejam aparentemente promissores, a tecnologia NIR exige uma contínua necessidade de calibração e controlo de qualidade, o que poderá transformar-se numa desvantagem num laboratório que trabalhe com diferentes amostras, diferentes matrizes e elevada variabilidade entre amostras. Mais amostras com características diferentes (por exemplo, tipos de solo,

adubações, condições edafo-climáticas diferentes) devem ser incorporados para expandir o domínio previsão e aumentar a precisão da previsão.

**Em suma:**

- Através dos resultados finais obtidos para as distintas calibrações (tabela nº 43 e 44) será possível que a espectrometria de infravermelho próximo seja uma boa alternativa aos métodos de referência, contudo serão necessários mais amostras para aumentar o rigor da calibração iniciada com este estudo.
- Com o estudo da fertilidade do solo e nutrição da planta foi possível observar que existem relações de antagonismo entre os minerais cálcio, magnésio e potássio e uma correlação positiva entre o potássio e o azoto, o que poderá vir a ser útil durante a adubação das vinhas;
- Os minerais cálcio, potássio e magnésio encontrados nas folhas poderão ser um bom indicador da presença desses mesmos minerais no vinho podendo evitar-se determinados problemas durante o processo de vinificação;
- Os primeiros estudos realizados demonstraram que poderá vir a ser possível criar uma logística durante a vindima de modo a não combinar uvas com maior teor de cálcio numa mesma cuba de fermentação.





---

*VI Capítulo*

*Estudios futuros*

---





## *VI - Estudos futuros*

Como George Bernard Shaw um dia proferiu “A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez” pelo que este estudo demonstrou muitas outras necessidades ligadas a esta problemática a serem estudadas.

Diversos fatores são responsáveis pela qualidade das uvas e conseqüentemente para o produto final que delas provier. O clima que a planta presenciou durante o seu crescimento, o clima que o fruto sofreu durante o seu desenvolvimento e maturação (ou seja, temperatura, exposição à radiação solar, precipitação, humidade relativa) interferem na fase de crescimento e produção da videira. Pelo que se pode considerar que estes elementos assim como as técnicas culturais utilizadas pelo viticultor são uns dos principais factores responsáveis pela produtividade da cultura. Para além disso segundo Van Leeuwen *et al.* (2004), para se obter uvas de qualidade, com elevado potencial enológico, é essencial que conhecer às características de solo de modo a se perceber qual a possibilidade de à partida se obter de plantas saudáveis e de qualidade e posteriormente estudar a nutrição da planta, ou seja conhecer a fertilidade do solo e nutrição da planta.

Assim sendo de forma a determinar atempadamente as características e posterior qualidade do vinho será importante no futuro calibrar o equipamento de infravermelho próximo para determinar o estado nutricional das plantas através da leitura das suas folhas e frutos, tal como já foi testado para as folhas de laranjeiras por Menesatti *et al.*, 2010, tendo obtido valores de correlação também bastante altos e promissores ( $R^2= 0.995$  e  $0,991$ ) e outros autores mencionados na tabela nº 45.

Tabela 45 - Estudos de avaliação nutricional a algumas plantas

<b>Autor</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Minerais estudados</b>
(Villatoro-Pulido <i>et al.</i> , 2012)	400 - 2500	Folhas de rúcula	Cálcio, Potássio, Magnésio, Zinco, Manganês, Ferro e Cobre
(Ward, Nielsen e Møller, 2011)	830-2500	Gramíneas	Potássio, Azoto e Fósforo
(Menesatti <i>et al.</i> , 2010)	400-1100	Folhas de Laranja	Potássio, Cálcio, Magnésio, Azoto, Fósforo, Zinco, Ferro e Manganês
(Petisco <i>et al.</i> , 2008)	1100-2500	Folha de árvores	Potássio, Magnésio, Cobre, Zinco e Ferro
(González-Martín, Hernández-Hierro e González-Cabrera, 2007)	1100-2000	Alfafa	Potássio, Cálcio, Fósforo, Manganês, Zinco e Ferro

Além de implicações enológicas e toxicológicas, a análise elementar é cada vez mais uma área de interesse para a diferenciação química dos vinhos e identificação da sua origem geográfica, tal como foi possível observar por Frias *et al.* (2001) que verificou uma boa diferenciação entre vinhos de acordo com a sua origem geográfica através do estudo dos teores de potássio, sódio, cálcio, magnésio e cobre. Contudo tem-se verificado que muitas das diferenças de catiões que se encontraram se podem dever às diferenças climatológicas que ocorreram durante os anos do estudo. Pelo que é necessário ter cautela ao tentar utilizar os minerais como um parâmetro de autenticidade do vinho pois é um estudo que deve ter em conta diversas variáveis e não só o teor mineral em separado.

Autenticidade e valor comercial dos vinhos (ou mais geralmente de alimentos) estão muitas vezes ligadas à sua origem geográfica e determinados países ou regiões são conhecidos por produzir excelentes vinhos e de alto valor comercial (Luykx e Ruth, 2008). Devido à sua composição e disponibilidade em todo o mundo, o vinho é muitas vezes um produto adulterado daí o interesse em se conseguir identificar a origem do vinho. Pelos pequenos estudos realizados através da análise de PCA (componentes principais) observou-se uma ligeira diferença entre os vinhos provenientes de solos de diferentes origens pelo que de futuro se deseja realizar mais análises minerais de forma a determinar outros elementos minerais importantes como o fosforo e o sódio e análise aos aminoácidos e amins. Sendo que estas últimas poderão ser importantes na medida que são afetadas não só pelo teor de aminoácidos e proteínas presentes na uva assim como são afetadas pelas praticas enológicas que são bastante característica de uma adega. Assim sendo o conhecimento sobre o conteúdo mineral parece ser importante na autenticidade do vinho, sendo de se esperar que no futuro próximo seja possível identificar fraudes ou adulterações mais facilmente através da determinação das características minerais do vinho (Pohl, 2007).

Apesar de neste estudo ter existido um baixo número de amostras foi possível determinar um modelo de calibração e validação para as duas matrizes em estudo, vinho e mosto e para os diferentes compostos estudados. Contudo a adição de amostras no futuro, se possível todos os anos, ao modelo irá enriquecer a calibração obtida e aumentar a gama de concentração tornando assim o sistema mais robusto.

Uma vez que nem todas as variáveis obtidas de um espectro de infravermelho próximo apresentam correlação com os parâmetros de interesse ou quando se correlacionam estas apresentam um ruído excessivo, verificou-se que no futuro dever-se-ia estudar um algoritmo que se pudesse aplicar na seleção de um subconjunto de variáveis espectrais. Ao se adotar uma seleção de variáveis como uma ferramenta de pré-processamento de dados seria possível melhorar a capacidade preditiva e aumentar a robustez dos modelos obtidos, bem como facilitar a interpretação dos resultados.

Outro estudo pretende-se com as mesmas calibrações obtidas neste trabalho serem realizadas em um aparelho de infravermelho médio com transformada de Fourier também bastante utilizado nas Adegas. De momento já se encontram em tratamento os espectros obtido pelo *WineScan FT 120* tecnologia FTIR (*Foss Electric, Denmark*). O tratamento estatístico e a calibração encontram-se a

cargo da empresa Foss contudo num estudo já preliminar foi possível observar que apesar de toda a gama espectral ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) obtida com a análise da amostra existem certas gamas espectrais que têm de ser eliminados para evitar que essas gamas possam interferir nos cálculos da calibração. Tal como Patz *et al.* (2004) observou os intervalos entre  $965-1580$ ,  $1700-2010$  e  $2701-2971\text{ cm}^{-1}$  permitem uma melhor calibração das características químicas do vinho uma vez que as gamas espectrais  $1580-1698$  e  $2010-2700\text{ cm}^{-1}$  dependem fortemente das fortes bandas de absorção de água e que a partir da gama espectral acima dos  $3.700\text{ cm}^{-1}$  pode ser eliminada uma vez que não apresenta nem visualmente nem graficamente picos significativos logo contém muito pouca informação útil a extrair, contudo muitos mais estudos deverão ser realizados nesta área para se tentar perceber se poderá ser uma boa alternativa à análise de minerais.

Um outro estudo que se poderá realizar no futuro estaria relacionado com o teor de azoto no mosto e a sua posterior adição. Visto que apenas é necessário para a segunda fermentação em garrafa do vinho espumante cerca de  $30\text{ mg/L}$  de azoto, e nos vinhos analisados obteve-se teores de azoto na ordem dos  $160$  a  $180\text{ mg/L}$  isto poderá significar que se poderá estar a adicionar azoto a mais ao mosto desnecessariamente pelo que seria interessante realizar um estudo de forma a otimizar a adição de azoto e reduzir os gastos associados à compra desse nutriente pelas adegas.

Por último, o outro estudo que se coloca é o estudo das proteínas no vinho de forma a saber a partir de que concentrações é que estas se podem tornar instáveis quando em presença das condições que as tornam inconstantes como a temperatura, a presença de metais e taninos, para que se possa no futuro eliminar através de colagens apenas a quantidade instável deixando a restante no vinho.





---

*VII Capítulo*

*Bibliografía*

---





# Bibliografia

- Álvarez, M., Moreno, I. M., Pichardo, S., Cameán, A. M. e González, A. G. (2012). Mineral profile of “ fino ” wines using inductively coupled plasma optical emission spectrometry methods, *135*, 309–313.
- Álvarez, M., Moreno, I. M., Pichardo, S., Cameán, A. M. e Gustavo González, A. (2012). Mineral profile of «fino» wines using inductively coupled plasma optical emission spectrometry methods. *Food Chemistry*, *135*, 309–313.
- Amorim, F. A. C., Lobo, I. P., Santos, V. L. C. S. e Ferreira, S. L. C. (2008). Espectrometria de absorção atômica: O caminho para determinações multi-elementares. *Quimica Nova*, *31*(7), 1784–1790.
- Amsden, B. e Turner, N. (1999). Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnology and bioengineering*, *65*(5), 605–10.
- Araujo, J. C. (2008). *Crescimento e marcha de absorção de nutrientes de bananeira (Musa sp. AAA), «Grande Naine» no primeiro ciclo de produção*. Universidade de São Paulo.
- Barbin, D. F., Valous, N. A., Dias, A. P., Camisa, J., Hirooka, E. Y. e Yamashita, F. (2015). VIS-NIR spectroscopy as a process analytical technology for compositional characterization of film biopolymers and correlation with their mechanical properties. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, *56*, 274–9.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A. e Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of bioscience and bioengineering*, *108*(2), 99–104.
- Basile, B., Reidel, E. J., Weinbaum, S. A. e DeJong, T. M. (2003). Leaf potassium concentration, CO<sub>2</sub> exchange and light interception in almond trees (*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb). *Scientia Horticulturae*, *98*(2), 185–194.
- Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. e Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines, *112*, 169–177.
- Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. e Ferreira, R. B. (2010). Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids. *Food Chemistry*, *122*(4), 1067–1075.
- Bell, S. J., e Hebschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(3), 242–295.
- Bergles, E. e Yang, W. (2009). Profiting from telecom investments: Taking advantage of the NIR First Overtone and Raman’s Spectral Fingerprints. *Photonics Spectra*.
- Bisson, L. F. (1993). Yeasts – Metabolism of sugars. Em G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 55–76). CRC Press.
- Böhm, J., Antunes, M. T., Andrade, R., Barroso, J. M., Cabrita, M. J., Cardoso, H. e Veloso, M. M.

- (2007). *Portugal Vitícola, O Grande Livro das Castas: enciclopédia dos vinhos de Portugal*. Lisboa: chaves Ferreira Publicações.
- Boulding, J. R. e Ginn, J. S. (2003). *Practical Handbook of Soil, Vadose Zone, and Ground-Water Contamination: Assessment, Prevention, and Remediation, Second Edition*. CRC Press.
- Brar, M. S., Bijay-Singh, Bansal, S. K. e Srinivasarao. (2011). Role of Potassium Nutrition in Nitrogen Use Efficiency in Cereals. *International Potash Institute*, Dezembro (29).
- Brereton, R. G. (2000). Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *The Analyst*, 125(11), 2125–2154.
- Brescia, M., Caldarola, V., De Giglio, A., Benedetti, D., Fanizzi, F. e Sacco, A. (2002). Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 177–186.
- Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2002). NH<sup>4+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567–584.
- Brunetto, G., Kaminski, J., Melo, G. W. de, Brunning, F. e Mallmann, F. J. K. (2006). Destino do nitrogênio em videiras «chardonnay» e «riesling renano» quando aplicado no inchamento das gemas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(3), 497–500.
- Burin, V. M. e Bordignon-Luiz, M. T. (2016). Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: influence of clarification process before alcoholic fermentation. *Food Chemistry*. 202, 417-425.
- Burin, V. M., Gomes, T. M., Caliari, V., Rosier, J. P. e Bordignon Luiz, M. T. (2015). Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchemical Journal*, 122, 20–28.
- Butcher, D. J. (2013). Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: a review. *Analytica chimica acta*, 804, 1–15.
- Capeche, C. L. (2008). *Noções sobre tipos de estrutura do solo e sua importância para o manejo conservacionista*. Rio de Janeiro.
- Caravana, T. (2015, Setembro). Vinhos do Alentejo – Facts & Figures. Obtido de [http://www.vinhosdoalentejo.pt/media/documents/20151102\\_4182d3.pdf](http://www.vinhosdoalentejo.pt/media/documents/20151102_4182d3.pdf)
- Cárdenas, V., Cordobés, M., Blanco, M. e Alcalà, M. (2015). Strategy for design NIR calibration sets based on process spectrum and model space: An innovative approach for process analytical technology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 28–33.
- Cardoso, J. V. (1965). *Os solos de Portugal, sua classificação, caracterização e génese*. Lisboa: Secretaria do Estado da agricultura - Direcção Geral dos Serviços Agrícolas.
- Carvalho, J. (2012). *Vinificações especiais*. Obtido de [http://evb.drappc.min-agricultura.pt/documentos/vinho/vinificacoes\\_especiais.pdf](http://evb.drappc.min-agricultura.pt/documentos/vinho/vinificacoes_especiais.pdf)
- Catarino, S., Curvelo-Garcia, A. S. e Bruno de Sousa, R. (2008). Contaminant elements in wines: A review. *Ciência Técnica Vitiv.*, 23(1), 3–19.

- Cavaco, M., Calouro, F. e Clímaco, P. (2005). Produção integrada da cultura da vinha. Oeiras: DGPC.
- Cecchini, F. e Morassut, M. (2010). Effect of grape storage time on biogenic amines content in must. *Food Chemistry*, 123(2), 263–268.
- Chang, C. W., Laird, D. A., Mausbach, M. J. e Hurburgh, C. R. (2001). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy—Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 65(2), 480.
- Chau, F. T., Liang, Y. Z., Gao, J. e Shao, X.-G. (2004). *Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Chavarria, G., Santos, H. P. dos, Zanús, M. C., Marodin, G. A. B. e Zorzan, C. (2011). Cobertura plástica sobre o vinhedo e suas influências nas características físico-químicas do mosto e do vinho. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 809–815.
- Chavarria, G., Santos, H. P. dos, Zanús, M. C., Zorzan, C. e Marodin, G. A. B. (2008). Caracterização físico-química do mosto e do vinho Moscato Giallo em videiras cultivadas sob cobertura de plástico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(7), 911–916.
- Chekri, R., Noël, L., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V. e Guérin, T. (2012). Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 97–107.
- Christensen, P. (2001). Use of Tissue Analysis in Viticulture. Obtido de <http://cetulare.ucanr.edu/files/82034.pdf>
- Cogdill, R. P., Anderson, C. A. e Drennen, J. K. (2005). Process analytical technology case study, part III: calibration monitoring and transfer. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), E284–97.
- Correa, I. e Polo, M. C. (1990). Treatments for the stabilization of wines against tartrate precipitations. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 30, 10–22.
- Costa, J. B. (1991). *Caracterização e Constituição do Solo* (4ª edição.). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Coutinho, J. F., Ahlrichs, J. L. e Magalhaes, N. P. (1984). Nutrition en magnesium, potassium et calcium dans les vignobles a. sols acides de la vallee du Douro (Portugal). *Progres agricole et viticole*, 28, 128–135.
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M. J., Dambergs, R. G., Cynkar, W. U., Janik, L. J., Skouroumounis, G. e Gishen, M. (2008). Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta*, 74(4), 711–6.
- Cozzolino, D., Murraya, I., Chreeb, A. e Scaife, J. R. (2005). Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 821–828.
- Curvelo-Garcia, A. S. e Barros, P. (2015). *Química enológica - métodos analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas*. Porto: Agrobook.
- Daliparthi, J., Barker, A. V. e Mondal, S. S. (1994). Potassium fractions with other nutrients in crops: A review focusing on the tropics. *Journal of Plant Nutrition*, 17(11), 1859–1886.

- Decreto-Lei n.º 108/99, de 31 de Março (1991). Diário da República.
- Decreto-Lei N.º 212/2004 de 23 de Agosto (2004). DIÁRIO DA REPÚBLICA — I SÉRIE-A N.º198.
- Decreto-Lei n.º 35846/46, de 2 de Setembro (1946). Diário da República, 1.ª série — N.º 198.
- Prete, V., Costantini, a., Cecchini, F., Morassut, M. e Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*, 112, 474–481.
- Delanoe, D., Maillard, C. e Maidondieu, D. (1997). *O vinho da análise à elaboração*. (F. L. de Castro, Ed.). Publicações Europa-América.
- Demarty, M., Morvan, C. e Thellier, M. (1984). Calcium and the cell wall. *Plant, Cell and Environment*, 7, 441–444.
- Directiva 85/591/CEE do Conselho, de 20 de Dezembro (1985). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 372.
- Dulude, G. R., Sotera, J. J. e Kahn, H. L. (1981). Determination of calcium in cement by flame atomic absorption spectrometry with strontium as an internal standard. *Analytical Chemistry*, 53(13), 2100–2102.
- Dunn, B. W., Batten, G. D., Beecher, H. G. e Ciavarella, S. (2002). The potential of near-infrared reflectance spectroscopy for soil analysis — a case study from the Riverine Plain of south-eastern Australia. *Animal Production Science*, 42(5), 607–614.
- Eichorn, K. W. e Lorenz, D. H. (1977). Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, (29), 119–120.
- EPA. (2000). Unregulated Contaminant Monitoring Regulation Analytical Methods and Quality Control Manual. *United States Environmental Protection Agency*, (EPA 815-R-00-006).
- Epsteins, E. e Bloom, A. J. (2006). *Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas* (2º edição.). Londrina: Editora Planta.
- Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M. e Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113(1), 28–35.
- Fabani, M. P., Arrúa, R. C., Vázquez, F., Diaz, M. P., Baroni, M. V e Wunderlin, D. A. (2010). Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chemistry*, 119(1), 372–379.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T. e Williams, P. A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72(2), 334–341.
- Fassbender, H. W. e Bornemisza, E. (1987). *Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina*. IICA.
- Fenoccino, P. e Pezzi, G. M. (1976). Teores de nitrogênio total e proteico em mostos brancos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 11, 121–24.

- Fernández-Navales, J., López, M.I., Sánchez, M. T., Morales, J. e González-Caballero, V. (2009). Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. *Food Research International*, 42(2), 285–291.
- Fernando Noé salazar González. (2007). *White wine continuous protein stabilisation*. Universitat Rovira i Virgili.
- Ferreira, M. M. C., Antunes, A. M., Melgo, M. S. e Volpe, P. L. O. (1999). Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22(5), 724–731.
- Ferreira, R. B., Piçara-Pereira, M. A., Monteiro, S. e Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins Introduction. *Food Science & Technology*, 12, 230–239.
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. a., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 230–239.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C. e Escribano-Bailón, M. T. (2010). Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds. *Talanta*, 82(5), 1778–83.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C. e Escribano-Bailón, M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 847–853.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2011). Multivariate analysis of sensory data of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano during ripening. Correlation with the phenolic composition of the grape skins Análisis multivariante de datos sensoriales de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano durante la maduración. *Corr. CyTA - Journal of Food*, 9(4), 290–294.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C. e Escribano-Bailón, M. T. (2013). Evaluation of sensory parameters of grapes using near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 118(3), 333–339.
- Flanzy, C. (2000). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. S.A. Mundi-Prensa Libros.
- Fonseca, J. A. e Meurer, E. J. (1997). Inibição da absorção de magnésio pelo potássio em plântulas de milho em solução nutritiva. *Revista brasileira de ciência do solo*, 21(1), 47–50.
- Fráguas, J. C., Sônego, O. R. e Júnior, A. F. (1996, Fevereiro). O dessecamento do cacho de uva. *Embrapa, CNPUV*, 1–4.
- Frias, S., Trujillo, J., Peña, E.e Conde, J. (2001). Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *European Food Research and Technology*, 213, 145–149.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I. e Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755.
- Fusi, M., Mainente, F., Rizzi, C., Zoccatelli, G. e Simonato, B. (2010). Wine hazing: A predictive assay

- based on protein and glycoprotein independent recovery and quantification. *Food Control*, 21(6), 830–834.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F. e Salinas, M. R. (2011). Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. *Food Chemistry*, 124(1), 106–116.
- Gastol, M., e Domagała-Swiatkiewicz, I. (2014). Trace Element Partitioning in 'Sibera' Grapevines as Affected by Nitrogen Fertilisation. *Journal South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 217–225.
- Gauglitz, Günter and Vo-Dinh, T. (Ed.). (2003). *Handbook of Spectroscopy*. Willey-VCH GmbH & Co. KGaA.
- Giokas, D., Paleologos, E., Veltsistas, P. e Karayannis, M. (2002). Micelle mediated extraction of magnesium from water samples with trizma-chloranilate and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 56(3), 415–424.
- Giovenzana, V., Civelli, R., Beghi, R., Oberti, R. e Guidetti, R. (2015). Testing of a simplified LED based vis/NIR system for rapid ripeness evaluation of white grape (*Vitis vinifera* L.) for Franciacorta wine. *Talanta*, 144, 584–91.
- Giri, N. C. (2003). *Multivariate Statistical Analysis: Revised And Expanded*. New York: CRC Press.
- Gomes, A. S. (2012). Ana Sofia Gomes da Silva Avaliação dos compostos fenólicos e voláteis ao longo da vinificação.
- Gómez, M. del M. C., Brandt, R., Jakubowski, N. e Andersson, J. T. (2004). Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 2953–61.
- Gómez-Nieto, B., Gismera, M. J., Sevilla, M. T. e Procopio, J. R. (2015). Fast sequential multi-element determination of major and minor elements in environmental samples and drinking waters by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Analytica chimica acta*, 854, 13–9.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M. e González-Cabrera, J. M. (2007). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(6), 2199–205.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. e Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *North-Holland Publishing Company*, 32(1), 195–198.
- Griffiths, P. R. e Haseth, J. A. de. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Grindlay, G., Mora, J., Gras, L. e Loos-Vollebregt, M. T. C. (2011). Atomic spectrometry methods for

wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. *Analytica Chimica Acta*, 691(1-2), 18–32.

Guardia, M. e Garrigues, S. (Eds.). (2015). *Handbook of Mineral Elements in Food*. Valencia.

Hall, D., Zhao, R., Dehlsen, I., Bloomfield, N., Williams, S. R., Arisaka, F. e Carver, J. A. (2016). Protein aggregate turbidity: Simulation of turbidity profiles for mixed aggregation reactions. *Analytical biochemistry*.

Helal, H. M. e Mengel, K. (1979). Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl salinity and potassium. *Plant and Soil*, 51(4), 457–462.

Ho, L. C., Hand, D. J. e Fussell, M. (1987). Improvement of tomato fruit quality by calcium nutrition. *Acta Horticulturae*, (481), 463–468.

Hollas, J. M. (2004). *Modern Spectroscopy* (Fourth edi.). John Wiley & Sons, Ltd.

Hopkins, W. G. e Hüner, N. P. A. (2008). *Introduction to plant physiology* (Fourth edi.). USA: John Wiley & Sons, Inc.

Hu, W., Zhao, W., Yang, J., Oosterhuis, D. M., Loka, D. A. e Zhou, Z. (2016). Relationship between potassium fertilization and nitrogen metabolism in the leaf subtending the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) boll during the boll development stage. *Plant Physiology and Biochemistry*.

Iannone, R., Miranda, S., Riemma, S. e De Marco, I. (2015). Improving environmental performances in wine production by a life cycle assessment analysis. *Journal of Cleaner Production*.

Iba, S. E. (2009). *Avaliação do estado nutricional da videira «Niagara rosada» em São Miguel Arcanji, SP*. Instituto Agronómico.

Ieggli, C. V. S., Bohrer, D., do Nascimento, P. C. e de Carvalho, L. M. (2011). Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 124(3), 1189–1193.

Infovini. (2015). Obtido a 18 de Novembro de 2015, de [www.infovini.com](http://www.infovini.com)

ISSO 17025 (2007). *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios e calibração*. Monte da Caparica.

IVV- Instituto da Vinha e do Vinho. (2015). Obtido a 15 de Novembro de 2015, de <http://www.ivv.min-agricultura.pt/>

Jackson, R. S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications* (Third Edit.). Academic Press.

Jaekels, N., Meier, M., Dietrich, H., Will, F., Decker, H. e Fronk, P. (2016). Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. *Food Chemistry*, 200, 38–45.

James, S. H. e Nordby, J. J. (2005). *Forensic science: An introduction to scientific and investigative techniques* (Secon Edit.). CRC Press.

Jesus, A., Silva, M. M. e Vale, M. G. R. (2008). The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 74(5), 1378–1384.

- Jones, R. L., Helen, O., Thomas, H. e Waaland, S. (2013). *The Molecular Life of Plants*. UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Jos, A., Moreno, I., González, A. G., Repetto, G. e Cameán, A. M. (2004). Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content. *Talanta*, 63, 377–382.
- Kemps, B., Leon, L., Best, S., De Baerdemaeker, J. e De Ketelaere, B. (2010). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 105(4), 507–513.
- Kment, P., Mihaljevič, M., Ettler, V., Šebek, O., Strnad, L. e Rohlová, L. (2005). Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*, 91(1), 157–165.
- Kmetov, V. (2003). Determination of calcium, iron and manganese in moss by automated discrete sampling flame atomic absorption spectrometry as an alternative to the ICP–MS analysis. *Talanta*, 59(1), 123–136.
- Korablev, O. I., Bertaux, J. L., Vinogradov, I. I., Kalinnikov, Y. K., Nevejans, D., Neefs, E. e Durry, G. (2004). Compact high-resolution echelle-AOTF NIR spectrometer for atmospheric measurements. *5th International Conference in Space Optics (ISCO 2004)*, 73–80.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R. e Koutinas, A. . (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377–397.
- Kourti, T. e MacGregor, J. F. (1995). Process analysis, monitoring and diagnosis, using multivariate projection methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 28(1), 3–21.
- Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Riva Violetta, M. e Giuffrida, M. G. (2013). Effect of pH on the protein profile and heat stability of an Italian white wine. *Food Research International*, 54(2), 1781–1786.
- Lara, R., Cerutti, S., Salonia, J. A., Olsina, R. A. e Martinez, L. D. (2005). Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(2), 293–7.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. (4 Edition.). Berlin: Springer-Verlag.
- Lasanta, C. (2012). Tartrate stabilization of wines, 28, 52–59.
- Lee, K. Y. e Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106–126.
- Leigh, R. A. e Wyn Jones, R. G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth and distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist*, 97(1), 1–13.
- Lepe, J. A. S. e Leal, B. I. (2004). *Microbiología enológica : fundamentos de vinificación* (3º Edición.). Ediciones Mundi-Prensa.
- Li, R., Volenec, J. J., Joern, B. C. e Cunningham, S. M. (2008). Potassium and nitrogen effects on

carbohydrate and protein metabolism in alfalfa roots. *Journal of Plant Nutrition*.

- Li, Y., Qin, J., Mattson, N. S. e Ao, Y. (2013). Effect of potassium application on celery growth and cation uptake under different calcium and magnesium levels in substrate culture. *Scientia Horticulturae*, 158, 33–38. doi:10.1016/j.scienta.2013.04.025
- Lima, A. e Bakker, J. (2011). Near-infrared spectroscopy for monitoring peripheral tissue perfusion in critically ill patients. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*, 23(3), 341–351.
- Lima, E. do V., Aragão, C. A., Morais, O. M., Tanaka, R. e Grassi Filho, H. (2001). Adubação NK no desenvolvimento e na concentração de macronutrientes no florescimento do feijoeiro. *Scientia Agricola*, 58(1), 125–129.
- Luykx, D. M. A. M. e Ruth, S. M. Van. (2008a). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107, 897–911.
- Luykx, D. M. A. M. e Ruth, S. M. Van. (2008b). Food Chemistry An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897–911.
- Magalhães, N. (2008). *Tratado de viticultura - A Vieira, A vinha e o «Terroir»* (1º edição.). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Manfroi, L., Miele, A., Rizzon, L. A. e Barradas, C. I. N. (2006). Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videiras conduzidas no sistema lira aberta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 290–296.
- Marengo, E. e Aceto, M. (2003). Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. *Food Chemistry*, 81, 621–630.
- Maria Costa Alves. (1992). *Caracterização Química de quatro castas produtoras de vinho do porto durante a maturação- estudo dos açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos livres*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants. Mineral Nutrition of Higher Plants* (Second edi.). London: Academic Press.
- Martelo-Vidal, M. J. e Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158, 28–34.
- Martens, H. A. e Dardenne, P. (1998). Validation and verification of regression in small data sets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44(1-2), 99–121.
- Martínez-Rodríguez, A. J. e Polo, M. C. (2000). Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1081–1085.
- Martini, F. (Ed.). (2013). *Chemometrics in Food Chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Martí-Raga, M., Marullo, P., Beltran, G. e Mas, A. (2016). Nitrogen modulation of yeast fitness and viability during sparkling wine production. *Food Microbiology*, 54, 106–114.
- Martí-Raga, M., Sancho, M., Guillamón, J. M., Mas, A. e Beltran, G. (2015). The effect of nitrogen

- addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *Food Research International*, 67, 126–135.
- Matejovic, I. (1993). Determination of carbon, hydrogen, and nitrogen in soils by automated elemental analysis (dry combustion method). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 24(17-18), 2213–2222.
- McKinnon, A. (1997). Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration. *Talanta*, 44(9), 1649–1658.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C. e Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(4), 571–83.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P. e Mendes-Faia, A. (2011). The Impact Of Nitrogen On Yeast Fermentation And Wine Quality. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 26(1), 17–32.
- Meneguzzo, J., Rizzon, L. A., Miele, A. e Ayub, M. A. Z. (2006). Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztraminer. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 527–532.
- Menesatti, P., Antonucci, F., Pallottino, F., Rocuzzo, G., Allegra, M., Stagno, F. e Intrigliolo, F. (2010). Estimation of plant nutritional status by Vis–NIR spectrophotometric analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv Tarocco]. *Biosystems Engineering*, 105(4), 448–454.
- Mengel, K., Viro, M. e Hehl, G. (1976). Effect of potassium on uptake and incorporation of ammonium-nitrogen of rice plants. *Plant and Soil*, 44(3), 547–558.
- Mesquita, P. R., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. e Ferreira, R. B. (2001). Effect of Wine Composition on Protein Stability. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52(4), 324–330.
- Mir-Marqués, A., Martínez-García, M., Garrigues, S., Cervera, M. L. e Guardia, M. (2016). Green direct determination of mineral elements in artichokes by infrared spectroscopy and X-ray fluorescence. *Food chemistry*, 196, 1023–30.
- Matthew J. Parry-Hill, Ian D. Johnson, and Michael W. Davidson. (2015) Molecular Expressions Microscopy Primer: Optical Filters - Acousto-Optic Tunable Filters - Interactive Java Tutorial. (2015). Obtido a 10 de Outubro de 2015, de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/filters/aotf/>
- Moore, D. P., Overstreet, R. e Jacobson, L. (1961). Uptake of magnesium & its interaction with calcium in excised barley roots. *Plant physiology*, 36(3), 290–295.
- Moore, J. C., DeVries, J. W., Lipp, M., Griffiths, J. C. e Abernethy, D. R. (2010). Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 330–357.
- Moreira, A., Carvalho, J. G. e Evangelista, A. R. (1999). Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(2), 249–255.

- Moreno-Arribas, V. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70(3), 309–317.
- Morrison, D. F. (1990). *Multivariate statistical methods* (3rd ed.). New York: McGrae-Hill.
- Morzan, E., Stripeikis, J. e Tudino, M. (2015). Towards broadening thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: Influence of organic solvents on the analytical signal of magnesium. *Analytical Chemistry Research*, 4, 1–7.
- Mpelasoka, B. S., Schachtman, D. P., Treeby, M. T. e Thomas, M. R. (2003). A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3), 154–168.
- Naes, T., Isakson, T., Fearn, T. e Davies, T. (2004). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester UK: NIR Publications.
- Nicolaï, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I. e Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 99–118.
- Nightingale, E. R. (1959). Phenomenological Theory of Ion Solvation. Effective Radii of Hydrated Ions. *The Journal of Physical Chemistry*, 63(9), 1381–1387.
- Nousiainen, J., Ahvenjärvi, S., Rinne, M., Hellämäki, M. e Huhtanen, P. (2004). Prediction of indigestible cell wall fraction of grass silage by near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 115(3-4), 295–311.
- OIV. (2015). Obtido 6 de Abril de 2016, de <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-analysis>
- OIV-MA-AS1-12: R2005. Compendium of international analysis of methods - OIV Guide for the validation – quality control.
- OIV-MA-AS2-01A - Density and Specific Gravity at 20°C. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts - OIV.
- OIV-MA-AS2-04 - Ash. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts -OIV.
- OIV-MA-AS2-08 - Wine turbidity. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts - OIV
- OIV-MA-AS312-01A - Alcoholic strength by volume. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts - OIV (Resolution Oeno 377/2009).
- OIV-MA-AS313-01 - Total acidity. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts - OIV.
- OIV-MA-AS313-15 - pH. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts - OIV (A31, Oeno 438-2011).
- OIV-MA-AS323-02B - Total nitrogen. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts. (Resolution Oeno 377/2009).

- Oliveira, F. A. de, Carmello, Q. A. C. e Mascarenhas, H. A. A. (2001). Disponibilidade de potássio e suas relações com cálcio e magnésio em soja cultivada em casa-de-vegetação. *Agricola*, 58(2), 329–335.
- Ouyang, Q., Chen, Q. e Zhao, J. (2016). Intelligent sensing sensory quality of Chinese rice wine using near infrared spectroscopy and nonlinear tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 154, 42–46.
- Ouyang, Q., Zhao, J. e Chen, Q. (2015). Measurement of non-sugar solids content in Chinese rice wine using near infrared spectroscopy combined with an efficient characteristic variables selection algorithm. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 151, 280–5.
- Ozbek, N. e Akman, S. (2016). Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. *Food Chemistry*, 192, 295–298.
- Pagani, T. B. (2008). *Rendimento e qualidade de uva e teores de nutrientes em solo e tecido vegetal em vinhedo cultivado na serra Catarinense sob adubação com N, K, cama de suíno e Serragem*. Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências agroveterinárias.
- Pashova, V., Güell, C. e López, F. (2004). White wine continuous protein stabilization by packed column. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1558–63.
- Patz, C.-D., Blicke, A., Ristow, R. e Dietrich, H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 81–89.
- Pawar, S. N. e Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279–305.
- Pedrosa, S. A., Menses, P. R. e Carmelo, A. C. (2010). Espectrorradiometria de reflectância de rochas carbonáticas na região do infravermelho de ondas curtas. *Revista Brasileira de Geociências*, 40(4), 593–599.
- Penacho, V., Valero, E. e Gonzalez, R. (2012). Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 176–82.
- Pereira, C. F. (2006). *Use of two-dimensional correlation spectroscopy and construction and evaluation of a near-infrared spectropolarimeter*. Universidade Estadual de Campinas.
- Perkins, W. D. (1986). Fourier Transform-Infrared Spectroscopy Part I. Instrumentation. *Journal of Chemical Education*, 63(1), A5–A10.
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez de Aldana, B. R., García-Ciudad, A. e Mediavilla, S. (2008). Ash and Mineral Contents in Leaves of Woody Species: Analysis by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(5-6), 905–925.
- Peuke, A., Jeschke, W. e Hartung, W. (2002). Flows of elements, ions and abscisic acid in *Ricinus communis* and site of nitrate reduction under potassium limitation 53. *Journal of Experimental Botany: Oxford Journals*, 53(367), 241–250.
- Picó e Yolanda. (2014). *Análise Química de Alimentos*. Elsevier Brasil.
- Pilkington, P. H., Margaritis, A., Mensour, N. A. e Russell, I. (1998). Fundamentals of immobilised yeast

- cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104(1), 19–31.
- Pimentel, M. F., Galvão, R. K. H. e Araújo, M. C. U. de. (2008). Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianálito. *Química Nova*, 31(2), 462–467.
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 941–949.
- Porep, J. U., Kammerer, D. R. e Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*.
- Portaria n.º 229-B/2008 de 6 de Março (2008). Diário da República, 1.ª série — N.º 47 — 6 de Março de 2008.
- Portaria n.º 296/2010 de 1 de Junho (2010). Diário da República, 1.ª série — N.º 106 — 1 de Junho de 2010.
- Portaria n.º 334/94 de 31 de Maio (1994). Diário da República I Série-B n.º 126.
- Portela, E. e Louzada, J. (2007). Deficiências de magnésio em solos e culturas do Norte de Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, 30(2), 67–86.
- Portela, E., Roboredo, M. e Louzada, J. (2003). Assessment and Description of Magnesium Deficiencies in Chestnut Groves. *Journal of Plant Nutrition*, 26(3), 503–523.
- Povia, G. S. (2007). *Determinação dos parâmetros de qualidade de detergentes em Pó utilizando espectroscopia no infravermelho próximo*. Universidade Estadual de Campinas.
- Pozo-Bayón, M. A., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Andujar-Ortiz, I. e Pueyo, E. (2010). Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rosé Cava sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1526–1532.
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E. e Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 289–299.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast (Chichester, England)*, 16(8), 675–729.
- Proenol (2003) Ficha técnica: ProElif Ft093-09. Obtido 6 Abril de 2015 de [http://proenol.com/images//editorials/PRoELif\\_FT093-10\\_PT.pdf](http://proenol.com/images//editorials/PRoELif_FT093-10_PT.pdf)
- Proenol (2015). Obtido 6 de Abril de 2015, de [http://www.proenol.com/catalogue.ud121?cat0\\_oid=-692&cat1\\_oid=-694](http://www.proenol.com/catalogue.ud121?cat0_oid=-692&cat1_oid=-694)
- Puguan, J. M. C., Yu, X., & Kim, H. (2014). Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. *Journal of colloid and interface science*, 432, 109–16. doi:10.1016/j.jcis.2014.06.048
- Quelhas dos Santos, J. (1996). *Fertilização - Fundamentos da utilização dos adubos e correctivos*.

Sintra: Publicações Europa-América.

- Quelhas, J. M. P. (2011). *Relação entre a composição mineral do vinho e a ocorrência do aroma reduzido*. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.
- Regulamento (CE) N.º 491/2009 do Conselho de 25 de Maio (2009). Jornal Oficial da União Europeia nº L154/1.
- Regulamento (CE) N.º 2870/2000 da Comissão, de 19 de Dezembro (2000). Jornal Oficial das Comunidades Europeias nº L 333.
- Regulamento (CE) N.º 606/2009 de 10 de Julho de 2009. , L193/1 Jornal Oficial da União Europeia 1–59 (2009). Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) N.º 607/2009 Da Comissão de 14 de Julho (2009). Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CEE) N.º 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro (1990). Jornal Oficial da União Europeia nº L 272.
- Reynier, A. (2002). *Manual de viticultura: guía técnica de viticultura*. Mundi-Prensa Libros.
- Riaz, S., Doligez, A., Henry, R. J., e Walker, M. A. (2006). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. (K. Chittaranjan, Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. e Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. e Lonvaud, A. (2006b). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. *Microbiology* (Second edi., Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Rizzon, L. A. e Miele, A. (2003). Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 156–161.
- Rizzon, L. A. e Miele, A. (2004). Avaliação da cv. Tannat para elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(2), 223–229. doi:10.1590/S0101-20612004000200011
- Rizzon, L. A., Miele, A., Meneguzzo, J. e Zanuz, M. C. (1999). Efeito de três processos de vinificação sobre a composição química e a qualidade do vinho Cabernet Franc. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(7), 1285–1293.
- Rizzon, L. A., Miele, A. e Scopel, G. (2009). Características analíticas de vinhos Chardonnay da Serra Gaúcha. *Ciência Rural*, 39(8), 2555–2558
- Rodríguez Mozaz, S., García Sotro, A., Garrido Segovia, J. e Ancín Azpilicueta, C. (1999). Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. *Food Research International*, 32(10), 683–689.
- Roger, G. S. e Nguyen, H. T. (1989). *Fundamentals of mathematical statistics : probability for statistics*. New York: Springer-Verlag.
- Rogiers, S. Y., Greer, D. H., Hatfield, J. M., Orchard, B. A. e Keller, M. (2006). Mineral sinks within ripening grape berries (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 45(3), 115–123.

- Ross, S. M. (1987). *Introduction to probability and statistics for engineers and scientists*. New York: John Wiley & Sons.
- Ruiz, J. M. e Romero, L. (2002). Relationship between potassium fertilisation and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Annals of Applied Biology*, 140(3), 241–245.
- Sánchez, M. T., De la Haba, M. J., Benítez-López, M., Fernández-Novales, J., Garrido-Varo, A. e Pérez-Marín, D. (2012). Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 102–108.
- Santos, J., Oliva-Teles, M. T., Delerue-Matos, C. e Oliveira, M. B. P. P. (2014). Multi-elemental analysis of ready-to-eat «baby leaf» vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food chemistry*, 151, 311–6.
- Santos, J. Q. (1996). *Fertilização. Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos* (Segunda Ed.). Lisboa: Publicações Europa-América.
- Sarmiento, M., Oliveira, J., Slatner, M. e Boulton, R. (2000). Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control*, 11(6), 423–432.
- Saure, M. C. (2005). Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Scientia Horticulturae*, 105(1), 65–89.
- Sauvage, F. X., Bach, B., Moutounet, M. e Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118(1), 26–34.
- Sauvage, L., Frank, D., Stearne, J. e Millikan, M. B. (2002a). Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 223–230.
- Sauvage, L., Frank, D., Stearne, J. e Millikan, M. B. (2002b). Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach. *Analytica Chimica Acta*, 458, 223–230.
- Schaefer, C., Lecomte, C., Clicq, D., Merschaert, A., Norrant, E. e Fotiadu, F. (2013). On-line near infrared spectroscopy as a Process Analytical Technology (PAT) tool to control an industrial seeded API crystallization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, 194–201.
- Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., Von Stockar, U. e Marison, I. W. (2000). Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 41–53.
- Silva, A. J. M. (2013). Les vins au goût d'argile : anatomie d'une tradition plurimillénaire. Le cas d'étude portugais du vin de talha. Em *138e Congrès des Sociétés Historiques et Scientifiques : Se nourrir, pratiques et stratégies alimentaires*. Rennes: Editions SHS.
- Silva, M. A. A. A. e Silva, G. A. da. (1987). *Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho. Circular Técnica 14*.
- Silva, T. das G., Regina, M. A., Rosier, J. P., Rizzon, L. A. e Chalfun, N. N. J. (1998). Winegrowing diagnostic of Southern Minas Gerais - Minerals content of the wines, 0–4.
- Silva, T. das G., Regina, M. de A., Rosier, J. P., Rizzon, L. A. e Chalfun, N. N. J. (2000). Winegrowing

- diagnostic of Southern Mians Gerais III: Acetic aldehydes, chlorides, total nitrogen and methanol contents of wines. *Ciência e Agrotecnologia*, 24(3), 605–609.
- Sirén, H., Sirén, K. e Sirén, J. (2015). Evaluation of organic and inorganic compounds levels of red wines processed from Pinot Noir grapes. *Analytical Chemistry Research*, 3, 26–36.
- Skoog, D. ., West, D. ., Holler, F. J. e Stanley, R. C. (2006). *Fundamentos de química analítica*. Thomson.
- Soufleros, E. ., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C. e Biliaderis, C. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, 80(2), 261–273.
- Suárez Lepe, J. A. (1997). *Leveduras vínicas: funcionalidad y uso en bodega*. Madrid: Mundi-Prensa Libros.
- Sun, D. W. (2009). Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Em *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (pp. 105–118). Elsevier.
- Sun, D. W., Cozzolino, D. e Damberg, R. G. (2009). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier.
- Sun, D. W. e Dufour, É. (2009). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5th Editio.). USA: Sinauer Associates, Inc.
- Togores, J. H. (2006). *La calidad del vino desde el viñedo* (Mundi-Pren.). Mundi-Prensa Libros.
- Togores, J. H., & Fernandez-Cano, L. H. (2011). *Tratado de viticultura II*. Editorial Paraninfo.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I. e Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food chemistry*, 127(3), 1072–83.
- Torresi, S., Frangipane, M. T. e Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129(3), 1232–1241.
- Tran, C. D. (1997). Principles and analytical applications of acousto-optic tunable filters, an overview. *Talanta*, 45(2), 237–248.
- Tran, C. D. e Lu, J. (1995). Characterization of the acousto-optic tunable filter for the ultraviolet and visible regions and development of an acousto-optic tunable filter based rapid scanning detector for high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 314(1-2), 57–66. doi:10.1016/0003-2670(95)00306-K
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Chone, X., Tregoat, O., Koundouras, S. e Dubourdieu, D. (2004). Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55(3), 207–217.
- Varela, C., Pizarro, F. e Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3392–400.
- Veiga, C. (2014). *Quantificação de azoto facilmente assimilável de uvas brancas e tintas da Tapada*

*da Ajuda em dois anos consecutivos (2013 e 2014). Validação e comparação da titulação formol e FT-MIR.* Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Velings, N. M. e Mestdagh, M. M. (1995). Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*, 3(3), 311–330.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S. e Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 145–57.

Villatoro-Pulido, M., Moreno Rojas, R., Muñoz-Serrano, A., Cardeñosa, V., Amaro López, M. Á., Font, R. e Del Río-Celestino, M. (2012). Characterization and prediction by near-infrared reflectance of mineral composition of rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* and *Eruca vesicaria* subsp. *vesicaria*). *Journal of the science of food and agriculture*, 92(7), 1331–40.

Vinhos do Alentejo. (2015). Obtido 18 de Novembro de 2015, de <http://www.vinhosdoalentejo.pt/denominacao.php?id=17&s=30>

Vinzi, V. E., Chin, W. W., Henseler, J. e Wang, H. (2010). *Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications*. New York: Springer Science & Business Media.

Voo, W. P., Ooi, C.-W., Islam, A., Tey, B. T. e Chan, E. S. (2016). Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. *European Polymer Journal*, 75, 343–353.

Ward, A., Nielsen, A. L. e Møller, H. (2011). Rapid assessment of mineral concentration in meadow grasses by near infrared reflectance spectroscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 11(5), 4830–9.

Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'Neill, B. K. e Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 215–225.

Welz, B. e Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry. Atomic Absorption Spectrometry* (Thrid.). Wiley-VCH.

White, P. J. e Broadley, M. R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*, 92, 487–511.

White, R. E. (2015). *Understanding Vineyard Soils*. Oxford University Press. Obtido de <https://books.google.com/books?id=gB55BgAAQBAJ&pgis=1>

Wold, S., Sjöström, M., e Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130.

Wold, S., Trygg, J., Berglund, A. e Antti, H. (2001). Some recent developments in PLS modeling. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 58, 131–150.

Wolf, F. I. e Cittadini, A. (2003). Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 3–9.

Wolf, F. I., Torsello, A. e Fasanella, S. (2003). Cell physiology of magnesium, *Molecular Aspects of Medicine* 24, 11–26.

- Wolpert, J., Walker, M. A., Webber, E., Bettiga, L., Smith, R., Verdegall, P. e Ingels, C. (2002). Field Evaluation of Winegrape Rootstocks. *Napa, CA: 103 American Vineyard Foundation, California Rootstock Commission, Viticulture Consortium*.
- Wu, Z., Peng, Y., Chen, W., Xu, B., Ma, Q., Shi, X. e Qiao, Y. (2013). NIR spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for monitoring and understanding of a hydrolysis process. *Bioresource technology*, 137, 394–9.
- Wu, Z., Xu, E., Long, J., Pan, X., Xu, X., Jin, Z. e Jiao, A. (2016). Comparison between ATR-IR, Raman, concatenated ATR-IR and Raman spectroscopy for the determination of total antioxidant capacity and total phenolic content of Chinese rice wine. *Food chemistry*, 194, 671–9.
- Xu, G., Wolf, S. e Kafkafi, U. (2002). Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition*, 25(4), 719 – 734.
- YouCellar (2015) Obtido 6 de Abril de 2015, de [www.youcellar.com/en/bunch-grape-vine.php](http://www.youcellar.com/en/bunch-grape-vine.php)
- Yúfera, E. P. (1998). *Química de los alimentos*. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.
- Zhang, C. (2007). *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Zmozinski, A. V, de Jesus, A., Vale, M. G. R. e Silva, M. M. (2010). Determination of calcium, magnesium and zinc in lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry using a three-component solution. *Talanta*, 83(2), 637–43.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. e Nury, F. S. (2012). *Production Wine Analysis*. Springer Science & Business Media.
- Zou, X. e Zhao, J. (2015). *Nondestructive Measurement in Food and Agro-products*. Springer.



---

*IV Capítulo*

*Anexos*

---





*Anexo 1*

Tabela 46 - Tabela detalhada sobre os dados utilizados para determinar as correlações entre os minerais presentes no solo e na folha da videira

<b>Amostra</b>	<b>Potássio no solo (meq/100g)</b>	<b>Cálcio no solo (meq/100g)</b>	<b>Potássio na folha (%)</b>	<b>Azoto na folha (%)</b>	<b>Cálcio na folha (%)</b>	<b>Magnésio na folha (%)</b>
1	0,70	11	0,95	2,64	2,2	0,28
2	0,51	10,5	1,16	2,57	2,5	0,38
3	0,73	13	0,74	2,64	2,3	0,289
4	0,74	11,9	0,8	2,64	2,34	0,291
5	0,69	10,4	1,17	2,64	2,4	0,3
6	0,67	12	0,79	2,6	2,44	0,31
7	0,20	10,37	1,18	2,4	2,9	0,47
8	0,22	11,7	0,92	2,41	2,87	0,46
9	0,67	11,4	1,04	2,59	2,41	0,28
10	0,28	10,41	1,15	2,47	2,9	0,42
11	0,28	11,5	1,03	2,48	2,94	0,43
12	0,73	7,7	1,5	2,64	2,4	0,28
13	0,61	7,99	1,38	2,58	2,3	0,3
14	0,23	11	1,1	2,4	2,91	0,43
15	0,38	10	1,26	2,5	2,8	0,41
16	0,30	11,1	1,12	2,44	2,89	0,44
17	0,17	9,74	1,29	2,4	3	0,52
18	0,54	10,8	1,02	2,57	2,4	0,38
19	0,34	10,88	1,02	2,475	2,81	0,41
20	0,28	9,6	1,24	2,49	2,9	0,42
21	0,28	11,87	0,81	2,49	2,91	0,43
22	0,27	11,89	0,8	2,48	2,7	0,44
23	0,13	9,8	1,21	2,4	3	0,51
24	0,72	11,4	0,86	2,64	2,37	0,25
25	0,52	10,52	1,28	2,54	2,58	0,35
26	0,74	11,4	0,99	2,67	2,4	0,26
27	1,00	10,9	1,02	2,77	2	0,19
28	0,71	9,87	1,22	2,61	2,3	0,25
29	0,68	11	1,06	2,6	2,35	0,24
30	0,61	7,77	1,55	2,54	2,5	0,31
31	0,24	8	1,43	2,42	2,81	0,45
32	0,68	10,7	1,15	2,61	2,38	0,269
33	0,78	9,5	1,31	2,7	2,3	0,245
34	0,78	10,4	1,19	2,68	2,31	0,25
35	0,57	7,99	1,4	2,54	2,4	0,34
36	0,62	10,7	1,11	2,58	2,42	0,26
37	0,40	11,49	0,9595	2,49	2,7	0,41
38	0,38	10,31	1,1716	2,5	2,9	0,42

Amostra	Potássio no solo (meq/100g)	Cálcio no solo (meq/100g)	Potássio na folha (%)	Azoto na folha (%)	Cálcio na folha (%)	Magnésio na folha (%)
39	0,57	11,74	0,7474	2,61	2,6	0,268
40	0,92	11,78	0,808	2,74	2,2	0,19
41	0,56	10,09	1,1817	2,6	2,4	0,38
42	0,35	12,79	0,7979	2,5	2,6	0,42
43	0,67	10,59	1,1918	2,67	2,4	0,28
44	0,66	11,6	0,9292	2,64	2,3	0,3
45	0,60	10,99	1,0504	2,59	2,46	0,27
46	0,51	10,22	1,1615	2,49	2,5	0,32
47	0,76	10,91	1,0403	2,67	2,4	0,21
48	0,55	8	1,515	2,5	2,54	0,32
49	0,79	8,12	1,3938	2,71	2,1	0,2
50	1,06	10,86	1,111	2,8	1,8	0,15
51	0,75	9,89	1,2726	2,71	2,4	0,25
52	0,72	10,3	1,1312	2,62	2,3	0,25
53	0,64	8,3	1,3029	2,53	2,56	0,29
54	0,24	10,93	1,0302	2,46	2,8	0,47
55	0,72	10,97	1,0302	2,64	2,3	0,24
56	0,83	10,11	1,2524	2,7	2,2	0,22
57	0,83	11,85	0,8181	2,71	2,29	0,21
58	0,60	12,81	0,808	2,59	2,3	0,31
59	0,66	10,12	1,2221	2,59	2,2	0,28
60	0,42	12,01	0,8686	2,51	2,6	0,391
61	0,41	9,12	1,2928	2,5	2,8	0,39
62	0,60	11,35	0,9999	2,61	2,4	0,323
63	0,97	11,09	1,0302	2,74	2,04	0,21
64	0,59	9,94	1,2322	2,59	2,5	0,32
65	0,37	11,01	1,0706	2,51	2,7	0,38
66	0,71	7,8	1,5655	2,65	2,3	0,26
67	0,69	8,6	1,4443	2,64	2,4	0,29
68	0,63	10,34	1,1615	2,59	2,4	0,3
69	0,54	8,74	1,3231	2,54	2,61	0,35
70	0,63	9,99	1,2019	2,6	2,41	0,276
71	0,46	8,7	1,414	2,49	2,67	0,36
72	0,65	10,54	1,1211	2,6	2,48	0,279
73	0,88	7,7	1,615	2,71	2,1	0,23
74	0,62	7,8	1,4938	2,6	2,39	0,3
75	0,60	10,01	1,211	2,63	2,4	0,291
76	0,53	8,8	1,3726	2,54	2,52	0,287
77	0,31	9,9	1,2312	2,48	2,8	0,44
78	0,60	10	1,1302	2,6	2,43	0,279
79	0,69	9,31	1,3524	2,71	2,3	0,279
80	0,69	12,01	0,9181	2,6	2,4	0,275

<b>Amostra</b>	<b>Potássio no solo (meq/100g)</b>	<b>Cálcio no solo (meq/100g)</b>	<b>Potássio na folha (%)</b>	<b>Azoto na folha (%)</b>	<b>Cálcio na folha (%)</b>	<b>Magnésio na folha (%)</b>
81	0,50	12,04	0,908	2,53	2,61	0,34
82	0,55	8,9	1,3221	2,58	2,61	0,283
83	0,35	12	0,96	2,5	2,7	0,44
84	0,34	8,71	1,38	2,47	2,8	0,43
85	0,50	11,11	1,09	2,54	2,62	0,36
86	0,81	11	1,12	2,7	2,1	0,24
87	0,49	8,75	1,32	2,54	2,61	0,37
88	0,31	10,4	1,16	2,47	2,77	0,45
89	0,59	7,5	1,65	2,56	2,51	0,287
90	0,58	11,4	1,05	2,57	2,57	0,285
91	0,52	9,4	1,26	2,55	2,61	0,289
92	0,45	11,91	0,84	2,5	2,7	0,4
93	0,69	12,01	0,9	2,61	2,4	0,275
94	0,50	9,7	1,27	2,54	2,61	0,35
95	0,71	11,98	0,89	2,61	2,3	0,25
96	0,96	9,3	1,28	2,78	2	0,22
97	0,68	11,09	1,02	2,64	2,39	0,272
98	0,65	10,91	1,14	2,62	2,41	0,271
99	0,58	9,35	1,25	2,61	2,54	0,27
100	0,60	10,19	1,13	2,6	2,5	0,27
101	0,65	7,7	1,6	2,59	2,41	0,27
102	0,75	7,6	1,48	2,67	2,4	0,24
103	0,75	7,7	1,49	2,66	2,4	0,249

## Anexo 2

Tabela 47 - Caracterização dos 79 vinhos utilizados para realizar a calibração do NIR

Amostra	Massa Volúmica (g/ml)	TAV (%vol.)	Acidez Volátil (g de Ác. acético/L)	Acidez Total (g de Ác. Tartárico/L)	pH	Açúcares Redutores
1	0,9914	10,8	0,59	5,67	3,22	3,5
2	0,9911	10,6	0,62	6,11	3,2	1,6
3	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
4	0,9906	10,7	0,54	5,82	3,2	1,8
6	0,9907	10,8	0,48	5,84	3,22	1,7
7	0,9897	11	0,78	5,67	3,21	1,7
8	0,9912	10,5	0,58	6,31	3,16	1,7
9	0,992	9,6	0,57	7,01	3,1	1,8
10	0,99	10,7	0,54	5,49	3,21	1,2
11	0,9909	10,2	0,57	6,09	3,16	1,5
12	0,991	10,5	0,58	5,7	3,18	2,2
13	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
14	0,9908	10	0,7	5,19	3,21	1,5
15	0,9908	10	0,68	5,22	3,2	1,5
16	0,9911	10	0,68	5,55	3,2	1,4
17	0,9908	10	0,68	5,22	3,2	1,5
18	0,9901	11,1	0,65	5,77	3,21	1,8
19	0,9913	10,7	0,7	6,7	3,15	2,3
20	0,9902	10,2	0,4	6,29	3,14	1,7
21	0,9903	11,2	0,66	6,46	3,15	2,4
22	0,9909	10,3	0,47	5,74	3,19	2,4
23	0,9911	9,8	0,6	5,15	3,22	1,4
24	0,9904	10,9	0,61	6,36	3,15	1,9
26	0,9902	10,8	0,63	6,15	3,15	1,7
5	0,9898	11,1	0,63	6,19	3,15	2
27	0,9906	10,2	0,46	5,56	3,21	1,3
28	0,9912	10,5	0,51	5,07	3,25	1,9
29	0,9892	11,3	0,6	5,6	3,22	1,7
30	0,9898	11,2	0,52	6,48	3,16	1,8
31	0,9919	9,4	0,4	6,31	3,15	1,4
32	0,9904	10,7	0,52	5,94	3,18	1,9
33	0,9901	11,1	0,54	5,99	3,19	1,7
34	0,9915	10	0,57	5,76	3,21	1,5
35	0,991	10,2	0,48	5,53	3,22	1,6
36	0,9904	10,5	0,46	5,88	3,18	1,8
37	0,9898	10,8	0,52	5,7	3,19	1,8
38	0,9897	11,2	0,53	6,39	3,17	1,9
39	0,9896	11,3	0,5	6,27	3,17	2,1
40	0,9906	10,7	0,56	5,87	3,2	1,9
41	0,9897	11,1	0,56	6,05	3,2	1,7

Amostra	Massa Volúmica (g/ml)	TAV (%vol.)	Acidez Volátil (g de Ác. acético/L)	Acidez Total (g de Ác. Tartárico/L)	pH	Açúcares Redutores
42	0,9918	10,6	0,52	6,58	3,16	2,4
43	0,9904	11,2	0,52	6,66	3,16	2,3
44	0,9902	11,3	0,5	6,9	3,14	2
45	0,9911	10	0,72	5,75	3,21	1,4
46	0,9905	11	0,48	6,96	3,12	1,9
47	0,9905	9,9	0,56	5,11	3,25	1,2
48	0,9905	10,8	0,44	5,95	3,19	1,7
49	0,9905	10,8	0,55	5,97	3,2	1,6
50	0,9902	11,1	0,58	6,24	3,18	2,3
51	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
52	0,9909	10,8	0,49	6,89	3,13	2,1
52	0,9905	10,7	0,49	5,86	3,17	1,9
53	0,9908	10,2	0,48	5,89	3,16	1,5
54	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
55	0,9896	11,2	0,47	6,24	3,16	1,9
56	0,9905	10,9	0,47	6,52	3,15	2
57	0,9899	11,1	0,51	6,27	3,16	1,9
58	0,9923	9,9	0,43	5,66	3,28	1,9
59	0,9896	10,8	0,51	5,19	3,22	1,2
60	0,9947	9,4	0,2	5,64	3,28	1,9
61	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
62	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
63	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
64	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
67	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
68	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
69	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
70	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
71	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
72	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
73	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2
74	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
75	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
76	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
77	0,9905	10,7	0,48	5,85	3,17	1,9
78	0,9912	10,5	0,59	6,05	3,2	1,7
79	0,9913	10,4	0,51	6,83	3,13	2

## Anexo 3

Tabela 48 - Comparação entre valores obtidos para o magnésio por espectrometria de absorção atômica e infravermelho próximo

<b>Magnésio no vinho</b>		<b>Magnésio no mosto</b>	
<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>
73,6575	73,9817	82,51	81,5763
33,9	34,3791	100,8125	99,7501
104,3425	104,2588	83,7125	85,0089
86,1575	86,2333	63,4425	62,2388
106,5375	106,5042	69,6275	71,0467
89,8275	89,7736	90,685	88,81
92,21	92,234	96,615	97,18269
80,635	80,4848	104,285	103,1367
95,4175	95,9709	101,35	101,9585
85,84	86,5063	75,5225	77,0196

Tabela 49- Comparação entre valores obtidos para o potássio por espectrometria de absorção atômica e infravermelho próximo

<b>Potássio no vinho</b>		<b>Potássio no mosto</b>	
<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>
849,51	849,7343	829,22	828,7778
554,27	553,9665	869,04	871,78
640,48	640,6755	724,18	726,2668
844,58	844,9992	700,72	701,1459
750,61	750,8583	736,46	734,2678
798,46	798,8999	798,46	799,0892
820,6	820,3077	843,34	842,3541
762,98	762,7734	851,34	850,3651
540,49	540,4519	813,12	814,0054
700,72	700,6398	775,97	776,084

Tabela 50- Comparação entre valores obtidos para o azoto por espectrometria de absorção atômica e infravermelho próximo

<i>Azoto no vinho</i>		<i>Azoto no mosto</i>	
<i>Valores de referência</i>	<i>Valores obtidos por NIR</i>	<i>Valores de referência</i>	<i>Valores obtidos por NIR</i>
152,775	152,4301	180,25	181,8671
170,625	170,7853	141,925	142,8157
80,5	80,4507	195,3	193,7822
143,22	143,0231	161	160,1382
82,0358	82,1253	274,545	273,4032
126,8521	127,0213	161	160,1382
69,9527	69,4932	192,05	189,954
75,3203	75,6621	100,065	100,6261
91,0325	91,2265	83,02	83,65852
102,0351	102,4521	74,27	73,5241

Tabela 51- Comparação entre valores obtidos para a proteína por espectrometria de absorção atômica e infravermelho próximo

<i>Proteína no vinho</i>		<i>Proteína no mosto</i>	
<i>Valores de referência</i>	<i>Valores obtidos por NIR</i>	<i>Valores de referência</i>	<i>Valores obtidos por NIR</i>
1,0752	1,0843	0,791	0,7903
0,887	0,8747	1,0036	1,0308
1,4339	1,4774	1,1471	1,131
1,2206	1,2166	0,9555	0,8995
0,9888	0,984	1,2294	1,118
0,8951	0,8975	0,8531	0,8115
1,0123	1,0333	0,7847	0,834
0,5715	0,5613	0,6753	0,604
1,5367	1,4982	0,4983	0,452
1,7161	1,7255	0,3715	0,4121

Tabela 52- Comparação entre valores obtidos para a turbidez por espectrometria de absorção atômica e infravermelho próximo

<b>Turbidez no vinho</b>	
<b>Valores de referência</b>	<b>Valores obtidos por NIR</b>
<i>21,9333</i>	21,7264
<i>1,7133</i>	1,7002
<i>1,6967</i>	1,7422
<i>4,2967</i>	4,0654
<i>13,7333</i>	13,7876
<i>2,0833</i>	2,1086
<i>136</i>	136,2249
<i>4,3867</i>	4,0896
<i>83,5</i>	83,1079
<i>27,0667</i>	27,218

## Anexo 4

### QUANTIFICATION OF CALCIUM IN SPARKLING WINES BY INFRARED SPECTROSCOPY

Joana. VESTIA<sup>1</sup>; Maria I. ROUXINOL<sup>1</sup>; Helena FERREIRA<sup>2</sup>; Ana E. RATO<sup>1</sup>; M. Rosário MARTINS; Sara RODRIGUES; João M. BARROSO<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, apartado 94 7002-554, Évora.

<sup>(2)</sup> Adega Cooperativa de Borba, Largo Gago Coutinho e Sacadura Cabral, 7150 Borba.

#### Abstract

Markets are increasingly competitive and the companies feel the urge to improve their manufacturing processes. Blending that with a larger control of quality and safety it was created a need to develop new methods of analysis each time more accurate, faster and with lower costs.

Alentejo is a region with a wide variety of soils, most of them are rich in calcium and potassium. In the production of sparkling wine many wineries use encapsulated yeast in alginate beads, instead of the traditional method, *champenoise*. The first method is faster, allowing a more versatile production, reducing the risk of contamination and features organoleptic characteristics similar to the traditional method (yeast free). However, encapsulated yeast spheres should be only used if the base wine matches a number of features, among them calcium content. In this study the calcium content in the wine was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) and by near-infrared spectroscopy. The AAS is a high sensitivity method clearly produces a reliable result, however it is very time consuming and produces great quantities of environmental waste, therefore the possibility of using near-infrared spectroscopy as a method was studied to be a fast, simple and clean alternative to the AAS.

It was obtained a calibration model with a variation coefficient higher than 0.98 which indicates that the near-infrared spectroscopy as an adequately alternative the ASS.

Keywords: sparkling wine, encapsulated yeast, calcium, atomic absorption spectroscopy, near-infrared spectroscopy.

## 1. INTRODUCTION

Wine is a complex matrix, besides water and alcohol contains a great variety of inorganic and organic components, such as sugars, organic acids, phenolic compounds, amino acids, metal elements, anthocyanins and non-coloured phenolic compounds (Jackson, 2008; Sperkova & Suchanek, 2005). The composition of wine is due to many factors related to the specific elements, such as, anthocyanins and non-coloured phenolic compounds, production area, grape variety, soil, climate, winemaking practices, transport and storage (Magalhães, 2008; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006; White, 2015). All these elements have a crucial influence on quality and flavour of wine products (Zoecklein, *et al.*, 2012). Particularly the amount of mineral elements in wine is believed to be of great interest, mainly due to their influence on wine technology as well as toxic effects (Jos *et al.*, 2004; Likar *et al.*, 2015).

The production technology of sparkling wine has a second fermentation in the bottle and the use of alginate capsules with yeast are necessary for this fermentation. Encapsulated allow direct inoculation into wine and are used rather than free yeasts to ensure an active minimum population of 1 million cells/ml of wine. Therefore, the use of encapsulated yeast will reduce the time and costs of production due to the suppression of riddling.

The yeast immobilization technique in calcium alginate is widely used in the food industry due to its high capacity of retention and preservation of cell viability (Velings & Mestdagh, 1995). The alginate is cheap, non-toxic, forms a highly versatile array and protects the active components from heat and moisture, thus increasing its stability and bioavailability (Funami et al., 2009), and meets the following requirements: non-degradable, availability, low cost and that is suitable for pH and low temperature (Torresi *et al.*, 2011). However, the use of encapsulated yeast in the base wine needs certain requirements. These yeasts should not be used in wine with a calcium content higher than 80 mg/L to avoid aggregation of alginate capsules due to calcium ion. However, a significant proportion of the wine in *Adega Cooperativa de Borba* contains a higher concentration of calcium, causing aggregation of alginate beads that will form a larger and less flexible structure. When fermentation and maturation is completely, is necessary to remove the alginate capsules. The aggregation of alginate beads will difficult the 'dégorgement' task. Due to elevated pressure inside the bottle the aggregate formation frozen before 'dégorgement' and get waste within the bottle, leaving the wine able to be merchantable, unless filtered. Filtration is a process that is costly, since it would require a new bottle, stopper and wine will lose some pressure and organoleptic qualities. To prevent this, it is necessary to know the calcium content in the base wine.

The main goal of this research is to implement a quick and accurate method to evaluate the calcium content in wine.

In the last decades, techniques like near infrared (NIR) spectroscopy have been developed for the determination of many parameters in wine (Giovenzana *et al.*, 2015; Kemps *et al.*, 2010; Martelo-Vidal & Vázquez, 2014; Sauvage *et al.*, 2002). The collected spectra, in this investigation, were recorded in reflectance mode, applying the fibre-optic probe directly onto the wine sample. The main advantage of AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter) technology involves its fast scanning speed (16,000 wavelengths per second) and a high spectral resolution (2–10 nm) (Gauglitz *et al.*, 2003; Sun & Dufour, 2009).

Chemometrics is crucial for interpretation of spectroscopic data and refers to a vast field of statistical and mathematical techniques that are used to extract relevant information from primary chemical or analytical measurements. (Chau *et al.*, 2004; Martini, 2013). With chemometric calibrations, it is possible to determined the relationships between instrumental and laboratory measurements. Partial Least Squares Regression (PLSR) was the main tool applied

to the full spectrum (1100–2300 nm, 1201 variables) (Wold *et al.*, 2001; Wold *et al.*, 2001). Cross-validation is the most popular method to optimize the number of factors of the model and to avoid the problem of over-fitting.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1.Reagents/Chemicals

Deionized water ( $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ) was obtained from a Milli-Q Water System™ (Millipore, Guyancourt, France). All reagents and solvents were of analytical-reagent grade.

### 2.2.Wine samples

Seventy-seven wine samples were collected in *Adega Cooperativa de Borba*, proceeded to the reading of the infrared equipment and then proceeded to the characterization analyses of the wine and only subsequently held its transformation into ashes.

Enological parameters were determined according to the International Organization of Vine and Wine methods (OIV, 2015).

Table 53- Characterization of the analysed wine

<i>Parameter</i>	<i>Mean</i>	<i>Parameter</i>	<i>Mean</i>
<i>Density (g/L)</i>	$0.9908 \pm 0,0007$	<i>Ash (g/L)</i>	$1.85 \pm 0,24$
<i>Reducing sugar (g/L)</i>	$1.82 \pm 0,33$	<i>pH</i>	$3.18 \pm 0,04$
<i>Alcoholic strength (% v/v)</i>	$10.58 \pm 0,44$	<i>Turbidity (NTU)</i>	$35.33 \pm 30,03$
<i>Total acidity (g/L tartaric acid)</i>	$6.05 \pm 0,49$	<i>Volatile acidity (g/L acetic acid)</i>	$0.54 \pm 0,09$

### 2.3.Experimental design

All material and containers were glassware. Containers and all material used for storing and treating the samples were cleaned by soaking them in a 10% (v/v)  $\text{HNO}_3$  solution for at least 24 h and rinsed abundantly with ultrapure water before use.

Hence, from each wine sample (bottle), two equivalent aliquots were digested and analysed. Wine samples were assumed to be homogeneous. The ash content was based on the method OIV-MA-AS2-04 : R2009.

All the analyses were carried out in duplicates after 30 days of bottle storage and the results expressed as mean values  $\pm$  standard deviation.

### 2.3.1 Determination of minerals

Acid Digestion: It was added 6 mL of 0.5 M hydrochloric acid (EMSURE®, 37% p.a.) to ashes and the solution was transferred into a digestion tube. Digestion proceeded at 140°C in a dry bath (Selecta, thermostat dry-blocks) until solution became translucent, filtered (Whatman n° 542) and then brought to a final volume of 50 mL with ultrapure water. Calcium was determined in the atomic absorption spectrometer (PerkinElmer model AAnalyst 800), according to specific methodology for these minerals. A hollow cathode lamp with flame was used for determining Ca. For Ca analysis, digestion solution was diluted at 10% (v/v) with a solution containing 20% (v/v) of lanthanum chloride solution at 2.5% (w/v).

Table 2. Optimum operating conditions for AAS.

<b>Lamp current (mA)</b>	10	<b>Measurement mode</b>	Peak area
<b>Wavelength (nm)</b>	422,7	<b>Calibration Mode</b>	Linear least squares
<b>Slit width (nm)</b>	1	<b>Fuel flow (L/min)</b>	2
<b>Air flow (L/min)</b>	13,5	<b>Workhead height (mm)</b>	0,2

The range of the calibration standards for calcium was 0–5 mg/L.

### 2.4. Analytical techniques

For the determination of mineral content of wines was performed by AAS (GBC, Avanta PM) in an air-acetylene flame. The correlations between the contents of the elements in wines digestion were expressed by Pearson correlation coefficients (cc).

### 2.5. NIR spectra collection

A laminar 5030 NIR Analyzer (Brimrose Corporation, Baltimore, USA), based on the Acousto-Optical Tunable Filter (AOTF) NIR principle, was used for spectral detection. This instrument is a portable device that can be used directly in the field on tree, although in this investigation the spectral acquisition was performed under laboratory conditions. NIR Spectroscopy is based on the absorption of electromagnetic radiation between 1100 and 2500 nm range using 1 nm wavelength increments and a 250 spectra per average, which represents a single measurement and it provides qualitative information on composition of samples measured.

### 2.6. Near infrared spectroscopy analysis and chemometrics

The raw spectra were statistically pre-treated for absorbance ( $\log 1/T$ ) transformation using SNAP 2.03 software (Brimrose, Crop, Baltimore, MD, USA). It was applied PLS to the two datasets (spectra and analytical data) to determine the optimal prediction. Moreover, light scattering affects path length and spectral corrections must be applied: several pre-treatments of the spectra were investigated.

Multiplicative signal correction (MSC) was tested for variations in light scattering. The first derivative was calculated because it is useful for extracting band-shift and band-shape features and in eliminating baseline effects. The influence of smoothing using Savitzky–Golay (SG) and baseline correction was also tested. Finally, prior to calibration, we used the SG and first derivatives to smooth the noisy spectra of Reflectance.

PLRS is a two-block linear regression method based on estimated latent variables. We applied this to the two datasets (spectra and analytical data) referring to the same objects to determine the optimal prediction. Light scattering affects path length and spectral corrections must be applied: several pretreatments of the spectra were investigated.

The following statistical indices were used to determine the significance of the calculations:  $R_2$  (coefficient of multiple determination) in calibration, cross-validation and prediction. PLS models were performed using Unscrambler v10.3 software (CAMO ASA, Oslo, Norway).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The mean calcium content of the seventy seven wine samples from Borba region was 162.07 mg/L. The results, expressed in milligram per litre, were the average of duplicate measurements.

The results of the enological parameters indicate that the grapes used were healthy and good vinification practices were applied (Pozo-Bayón *et al.*, 2009). All sparkling wine samples showed enological parameters within the ranges established by Portuguese regulations for sparkling wines.

#### 3.1. Figures of merit

The limit of detection (LOD) was calculated as 3 times the standard deviation ( $\sigma$ ) of 10 repetitive aspiration of a digested wine sample with lowest emission signal around baseline level ( $3\sigma/\text{slope of calibration graph}$ ). The limit of quantification (LOQ) was calculated similar to LOD with only difference that 10 times of the standard deviation of 10 repetitive aspiration of a digested wine sample with lowest emission signal around baseline level was taken. The LOD and LOQ values of the method were 0.15 and 0.45 mg/L for calcium. Analytical parameters were summarized in Table 3.

Table 3. Figures of merit of the method.

<b>R<sub>2</sub></b>	<b>0.999</b>
<b>Limit of detection</b>	0.15 mg/L
<b>Limit of quantification</b>	0,45 mg/L
<b>Precision</b>	99,15%
<b>% Recovery</b>	98,13%

The analytes added to a digested wine sample were recovered quantitatively which meant that the sensitivities of the analytes were not significantly influenced from sample matrix.

The recoveries of spike addition tests performed with other cheese varieties were satisfactory as well, and the analytes added to the sample digests were successfully recovered 98,13%. Therefore, the analytes were reliably determined using aqueous standards. The RSD values of repetitive aspirations of the sample digests for all analytes were around 4,04%.

### 3.2. Calibration

To obtain the calibrations, a starting set of 77 wine white. The NIR spectrum of wine is dominated by two large absorption bands that correspond to O-H bonds around 1400 and 1900 nm, corresponding to water and ethanol, respectively.

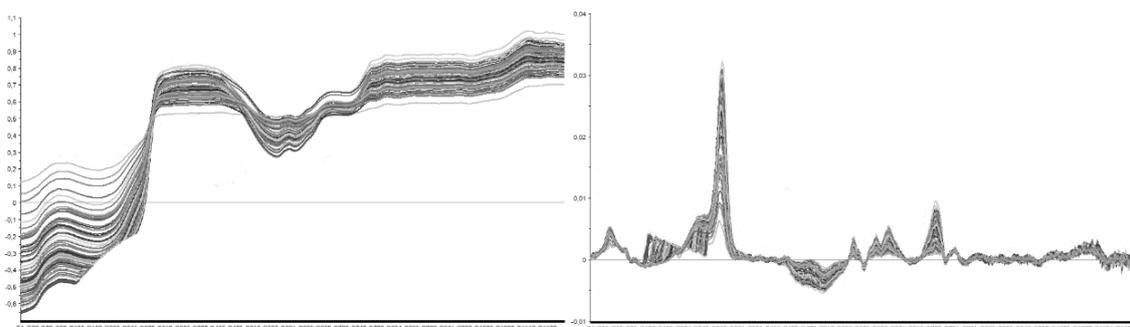


Figure 63-shows the spectra of all samples and the spectra with Savitzky–Golay (SG) and baseline correction.

The calibration process was implemented with the spectra of the resulting samples and their chemical data. Calibrations were performed by partial least squares regression (PLS). Models' evaluations were performed by cross-validation. Using this process, we validated the models used and checked their prediction capacities.

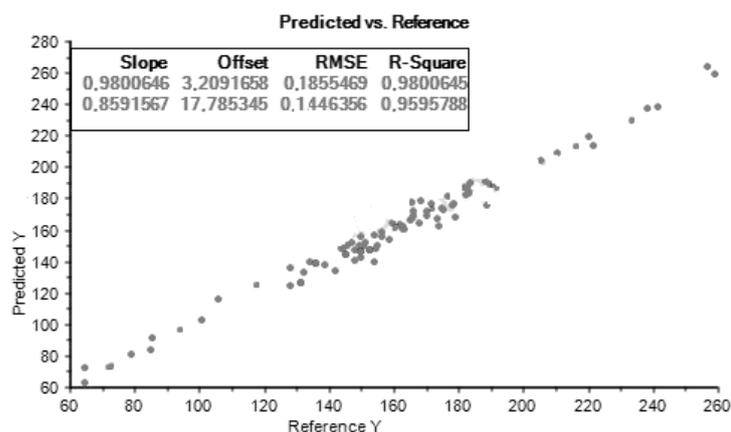


Figure 64- shows the correlation of the values obtained in the laboratory with respect to those predicted by NIR for calcium.

The accuracy of the PLS was described by the coefficient of determination in calibration ( $R_2$ ) and cross-validation or prediction the root mean square error of calibration (RMSEC) and the root mean square of cross-validation (RMSECV).

Table 4- shows the results obtained for calibration

<b>Slope</b>	<b>0,980</b>
<b>Offset</b>	3,209
<b>RMSEC</b>	0,186
<b>RMSECV</b>	0.146
<b><math>R_2</math></b>	0,980
<b>BIAS</b>	0,002

### 3.3.External validation

It was confirmed the robustness of the method by applying NIR technology to 10 new samples. The calibration equations obtained were applied and the predicted values were compared with the reference data for calcium determined by atomic absorption spectrometry. There were no differences between the results obtained, so it can be concluded that the method provides significantly identical data.

Table 5- shows the results obtained in the external validation.

<i>Reference</i>	<i>Validation</i>
64,6657	65,095
84,8193	84,8357
147,9147	148,506
182,1917	181,4704
100,7043	99,9519
259,1043	259,4159
220,2677	219,2829
132,1837	132,7354
189,4753	189,4262
85,6807	86,0998

#### 4. CONCLUSIONS

The results of this study were obtained from a single vintage and two grape variety and thus further studies on other vintages and varieties are need to increase the calibration samples.

Calcium values obtained by the AAE, in the studied wines, range between 64.69 and 230.10 mg/L. However, the calcium content of sparkling wines may not exceed 80 mg/L, due to the risk of aggregation with alginate capsules. The high calcium levels found in this study emphasize the need to analyse the wine with regard to this parameter so that the agglomeration of the alginate spheres can be avoided during the second fermentation in the bottle. In the near future should be possible to create a logistics during harvest to separate white grapes according to their calcium content to avoid combining grapes with high calcium levels in a single fermentation vat.

The existence of alternative analytical methods that can be fast and able to faithfully reproduce the results obtained by the reference methods is an asset to any industry.

The objective was to establish a rapid, high-throughput and low-cost analytical method to monitoring wine quality in second fermentation of sparkling wine. The results confirmed the ability of NIR-AOTF to predict calcium content, because the value of coefficient correlation is high and the value of RMSE and BIAS is low.

#### ACKNOEWLEDGMENTS

We would like to thank *Adega Cooperativa de Borba* winery for providing white wine samples and Laboratório da Água da Universidade de Évora for the analysis on the AAS equipment.

## REFERENCES

- Chau, F.-T., Liang, Y.-Z., Gao, J., & Shao, X.-G. (2004). *Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755.
- Gauglitz, Günter and Vo-Dinh, T. (Ed.). (2003). *Handbook of Spectroscopy*. Willey-VCH GmbH & Co. KGaA.
- Giovenzana, V., Civelli, R., Beghi, R., Oberti, R., & Guidetti, R. (2015). Testing of a simplified LED based vis/NIR system for rapid ripeness evaluation of white grape (*Vitis vinifera* L.) for Franciacorta wine. *Talanta*, 144, 584–91.
- Kemps, B., Leon, L., Best, S., De Baerdemaeker, J., & De Ketelaere, B. (2010). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 105(4), 507–513.
- Martelo-Vidal, M. J., & Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158, 28–34.
- Martini, F. (Ed.). (2013). *Chemometrics in Food Chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Sauvage, L., Frank, D., Stearne, J., & Millikan, M. B. (2002). Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach. *Analytica Chimica Acta*, 458, 223–230.
- Sun, D.-W., & Dufour, É. (2009). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Elsevier.
- Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129(3), 1232–1241.
- Velings, N. M., & Mestdagh, M. M. (1995). Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*, 3(3), 311–330.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2)
- Wold, S., Trygg, J., Berglund, A., & Antti, H. (2001). Some recent developments in PLS modeling. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 58, 131–150.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & S., F. N. (2012). *Production Wine Analysis*. Springer Science & Business Media.

## Anexo 5

### Determinação de minerais em vinho

Joana. VESTIA<sup>1</sup>; Maria I. ROUXINOL<sup>1</sup>; Helena FERREIRA<sup>2</sup>; Ana E. RATO<sup>1</sup>; M. Rosário MARTINS; Sara RODRIGUES; João M. BARROSO<sup>1</sup>

(1) Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, apartado 94 7002-554, Évora.

(2) Adegas Cooperativas de Borba, Largo Gago Coutinho e Sacadura Cabral, 7150 Borba.

A evolução dos produtos alimentares aliada à elevada qualidade dos mesmos fez com que o consumidor em geral, no ato da compra de produtos alimentares tome consciência e procure a qualidade e a segurança desses produtos, valorizando bastante determinados atributos, como sabor, cor e o aspeto. O conhecimento dos teores de potássio, cálcio e magnésio em mosto e vinhos assume especial importância devido às suas implicações na escolha de determinados procedimentos da vinificação e na estabilidade físico-químicas do vinho.

Neste trabalho comparou-se a leitura direta do vinho pelo espectrofotómetro de absorção atómica e um pré-tratamento simples e rápido a realizar ao vinho de modo a tornar o método de determinação de minerais em vinho com menores interferências de matriz. Como se verificou um menor erro associado a este método entre réplicas decidiu-se proceder à validação do método alterado.

De modo a demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é exercido, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida é preciso recorrer ao processo de validação de qualquer método analítico de forma a uniformizar os critérios utilizados.

A validação do método estudado permitiu a avaliação da calibração analítica através do estudo da linearidade da reta de calibração ( $R^2=0,99$ ), permitiu determinar os limites de deteção (entre os 0,05 e os 0,15 mg/L) e quantificação (entre os 0,16 e os 0,48 mg/L) assim como possibilitou avaliar as taxas de recuperação (entre os 98 e os 100,38%) e uma exatidão do método entre os 98 e os 99% para cada elemento. Com todos estes parâmetros avaliados foi possível determinar que método alterado poderá ser utilizado como um método de rotina exato, preciso e fiável.

Assim sendo o método proposto neste trabalho cumpre todas as características analíticas necessárias para a determinação de minerais em vinho e mosto.