

Estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro.

Paula Alexandra Carneiro Araújo

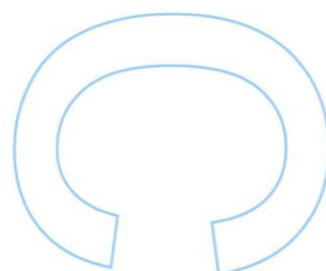
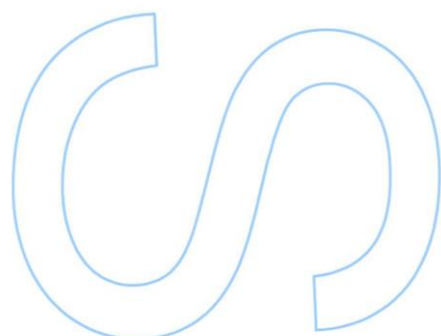
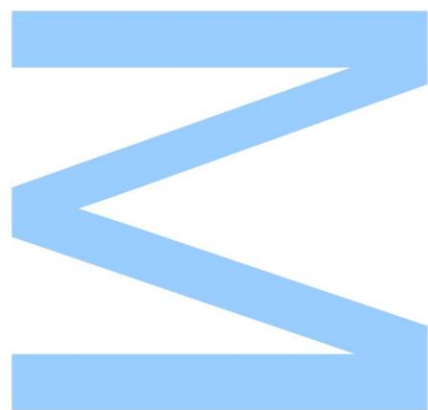
Mestrado de Viticultura e Enologia
Departamento de Química
2015

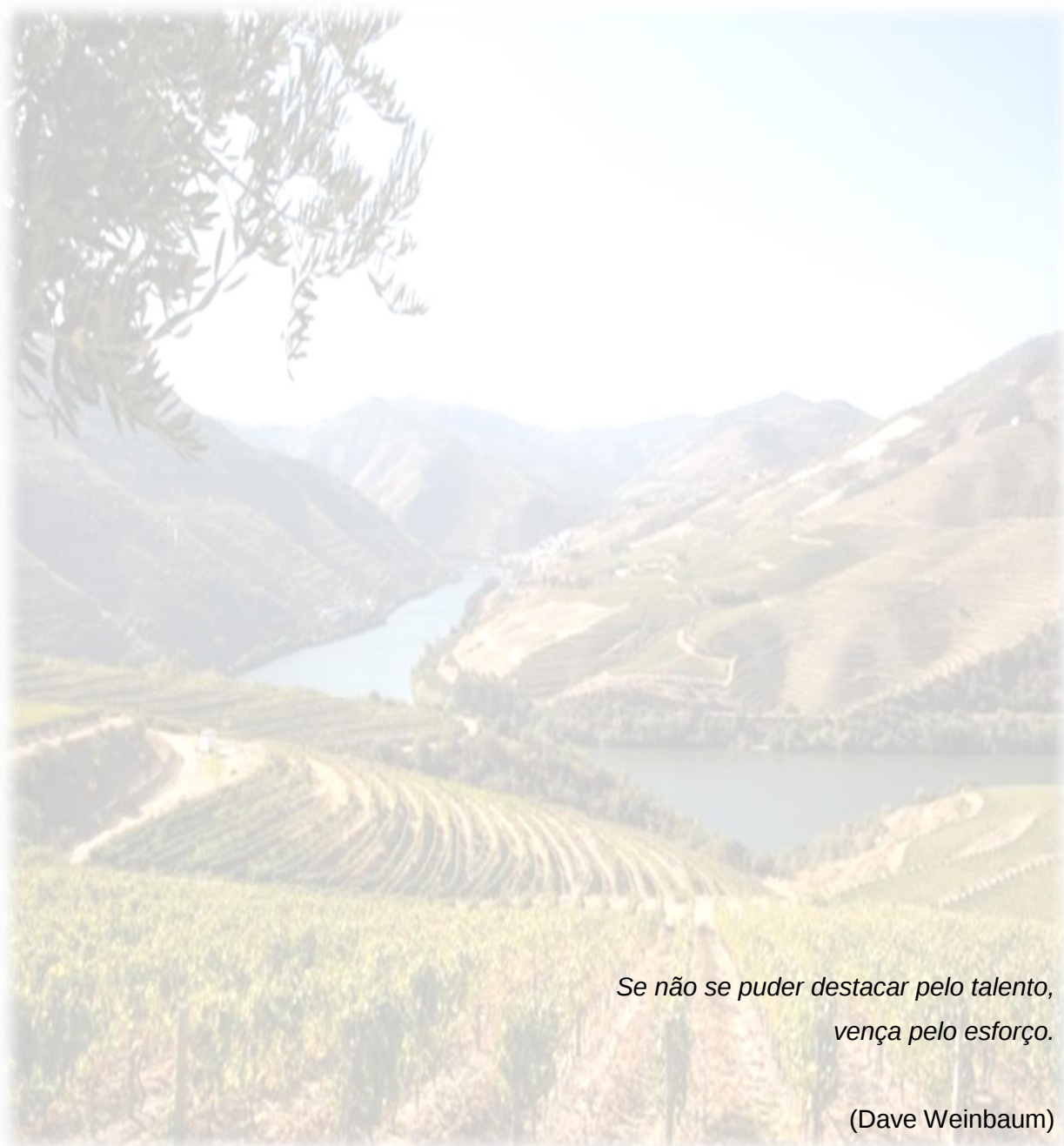
Orientador

Doutora Joana Oliveira, Investigadora, FCUP

Co-orientador

Doutor Vítor de Freitas, Professor Catedrático, FCUP





*Se não se puder destacar pelo talento,
vença pelo esforço.*

(Dave Weinbaum)

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar à Doutora Joana Oliveira, orientadora desta dissertação, por toda a partilha de ensinamentos, pelo apoio, incentivo e disponibilidade que me concedeu, e ainda pela amizade que sempre demonstrou.

Ao Professor Doutor Victor de Freitas e ao Professor Nuno Mateus, pela oportunidade que me deram em desenvolver esta dissertação dentro do seu grupo de investigação, e pelo apoio, disponibilidade e amizade.

À Doutora Zélia pela realização de todas as análises de GC-MS e LC-MS, e por toda a paciência e disponibilidade prestada.

A todos os meus colegas e amigos de laboratório, em especial à Iva, à Ana Luísa, Joana Azevedo, à Rosa, à Sílvia, à Elsa, à Susana, à Natércia, ao Luís, ao Ricardo e ao Raúl, pela boa disposição e bom ambiente, pela amizade e pelo apoio constante, que me deram ao longo de toda esta caminhada.

Às minhas amigas Ana Gomes, Joana Brás e Cláudia Alves pela grande amizade, pelos bons conselhos, e pelo companheirismo e camaradagem.

À minha Mãe, ao meu Pai, à minha Irmã, e a toda a minha família, por todo o carinho, compreensão, ajuda e incentivo que sempre me deram durante este percurso.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, pelos ensinamentos e por me ter recebido como aluna de Mestrado.

À Empresa Gran Cruz Porto Sociedade Comercial de Vinhos Lda, por ter cedido todas as amostras do vinho de mesa, e pela incansável disponibilidade prestada ao longo do trabalho.

À WS – Wine Solutions, Lda por ter fornecido todas as aparas de madeira, utilizadas no estudo.

Resumo

O presente trabalho incidiu, por um lado, no estudo da composição fenólica de aduelas de madeira de carvalho francês com três queimas diferentes e, por outro lado, no estudo do perfil polifenólico de um vinho de mesa de casta Touriga Nacional em contato com os três tipos de tostas de aduelas, durante um período de seis meses. Foi também realizada, uma comparação deste mesmo vinho estagiado em barricas de madeira com graus de tostagem semelhantes.

Na primeira parte do trabalho, de forma a determinar a composição química das aduelas de madeira com os três graus de queima diferentes, procedeu-se à identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes em cada uma das tostas. Verificou-se que não existiam diferenças ao nível do tipo de compostos presentes nas diferentes aduelas, sendo a diferença ao nível da quantidade em que cada composto existe nas diferentes tostas. A aduela que se evidenciou com um maior teor de aldeídos totais foi, a aduela de queima média (C.O. FOM). Foi também realizado uma análise dos compostos voláteis de cada madeira e os resultados revelaram-se semelhantes aos referidos anteriormente. Em relação aos resultados obtidos pela análise do Índice de Folin Ciocalteu, verificou-se que a aduela de queima forte (C.O.FOM⁺) é a que apresenta valores mais elevados, o que se traduz numa maior concentração de compostos fenólicos. Quanto à análise do DPPH e FRAP, os resultados são semelhantes, observando-se que as aduelas de queima ligeira e forte são as que apresentam valores mais elevados para ambos os parâmetros.

Na segunda parte do trabalho, efetuou-se um estudo comparativo da evolução de um vinho de mesa tinto de casta Touriga Nacional, estagiado com aduelas e estagiado em barricas de madeira de carvalho francês com diferentes tostas, durante um período de 6 meses. Para tal, procedeu-se à avaliação de vários parâmetros, nomeadamente intensidade corante, taninos proantociânicos totais, antocianinas livres totais, índice de diálise, poder tanante; e à avaliação das propriedades antioxidantes (DPPH e FRAP). Os resultados encontrados para os vinhos em contato com as aduelas de queima ligeira, média e forte, foram comparados entre si, entre os da testemunha e entre os dos cascos da tosta correspondente, tendo-se constatado que os vinhos envelhecidos nos cascos/barricas são os que apresentam maior influência nos vários parâmetros analisados, quando comparados com as aduelas. Por fim, e de forma a complementar os resultados obtidos para as análises físico-químicas, realizou-se uma análise sensorial de todos os vinhos, onde se observou melhores resultados ao nível das características

aromáticas, de boca e adstringência, para os vinhos envelhecidos nos cascos quando comparados com o mesmo vinho envelhecido em contato com as aduelas.

Palavras-chave: vinho de mesa tinto; carvalho francês; aduelas; barricas; tostar; estágio/envelhecimento.

Abstract

The present work focused on the study of the phenolic composition of French oak staves with three different thermal treatments. Furthermore the polyphenolic profile of a red table wine (*Vitis vinifera* L. varietal caste Touriga Nacional) storage in contact with the these three oak staves was also evaluated for a period of six months. It was also carried out a comparison of the same wine aged in wooden barrels with similar degrees of toasting.

In the first part of this work the phenolic composition of French oak staves with three different toasting treatments was evaluated as well as the individual quantification of phenolic compounds. The phenolic compounds were individually identified/ quantified and although there were no differences on the analytical composition of the three different staves, significant differences were observed in the amount of individual compounds present in the three staves subjected to different thermal treatments.

The medium toast stave (C.O. FOM) evidenced a higher content in total aldehydes. The content on volatile compounds was also determined and the results obtained revealed the same behavior. Regarding the Folin Ciocalteu index, the strong toast stave (C. O. FOM⁺) showed higher values, resulting on a higher concentration on phenolic compounds. Furthermore, the antioxidant activity of the three staves was evaluated using DPPH and FRAP methods. The results obtained evidenced the same tendency for both parameters as both mild and strong burning staves evidenced higher values for antioxidant activity.

In a second part of this work a comparative study of the polyphenolic composition of a red table wine (*Vitis vinifera* L. varietal caste Touriga Nacional), staged with staves with three different thermal treatments and the same red table wine aged in wooden French oak barrels with similar toasts, over a period of six months was evaluated. The assessment of different parameters such as color intensity, total proanthocyanins tannins, total free anthocyanins, dialysis index, tanning power and antioxidant activity (DPPH and FRAP) was performed. During the six months period the polyphenolic composition of the wines staged with the three different staves (slight, medium and strong burn), was compared between themselves and likewise with the control wine aged and with the wines aged in wooden barrels with the same corresponding burning treatment. The results obtained clearly showed that the wines aged in oak barrels showed significant changes in the polyphenolic parameters studied compared with the wines staged with staves.

Finally in order to complement the results obtained for the physical and chemical analysis, a sensory analysis of all wines was also performed. Similarly to what was observed for the phenolic composition evolution, the wines aged in wooden oak barrels also exhibited higher differences particularly related to the aromatic characteristics, of mouth and astringency, when compared to the same wine aged with the different staves.

Keywords: ageing; barrel; burning treatments; French oak; red table wine; staves.

Índice

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract.....	9
Índice	11
Índice de Figuras.....	15
Índice de Tabelas	19
Lista de Abreviaturas	21
Introdução Geral.....	23
1 Flavonóides	26
1.1 Flavan-3-óis.....	27
1.1.1 Proantocianidinas	28
1.1.2 Propriedades dos Taninos.....	32
1.2 Antocianinas	33
1.2.1 Formas de equilíbrio das antocianinas.....	36
1.2.2 Copigmentação	38
1.2.3 Reacção das antocianinas com bissulfito	39
2 Não-Flavonóides	40
2.1 Ácidos Fenólicos	40
2.2 Estilbenos	41
Objetivo	43
Descrição do Trabalho.....	45
Capítulo I.....	47
Identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas aduelas de madeira de carvalho francês sujeitas a diferentes tratamentos térmicos.....	47
I. Introdução	49
1 Aduelas de madeira de carvalho.....	50
2 Composição química da madeira.....	52
2.1 Compostos de baixo peso molecular	53
2.1.1 Ácidos Fenólicos	53
2.1.2 Aldeídos Fenólicos	54
2.1.3 Aldeídos Furânicos.....	54
3 Influência do tratamento térmico na composição da madeira	55

II. Material e Métodos.....	59
1 Amostras de madeira.....	59
2 Extração e isolamento dos ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos da madeira	59
3 Identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos das aduelas de madeira, por HPL-DAD e LC-MS	61
3.1 Padrões de ácidos fenólicos	61
3.2 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)	61
3.3 Análise cromatográfica dos ácidos fenólicos com detecção por espectrometria de massa (LC-MS)	62
3.4 Padrões de aldeídos.....	63
3.5 Análise dos aldeídos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)	64
3.6 Análise cromatográfica dos aldeídos com detecção por espectrometria de massa (LC-MS)	64
3.7 Preparação do extrato para análise dos compostos voláteis da madeira por cromatografia gasosa (GC-MS)	65
3.8 Análise cromatográfica dos compostos voláteis da madeira com detecção por espectrometria de massa (GC-MS).....	65
4 Índice de Folin Ciocalteu.....	66
5 Propriedades antioxidantes da madeira.....	66
5.1 Capacidade Antirradicalar (DPPH).....	66
5.2 Avaliação do Poder Redutor (FRAP)	67
6 Análise Estatística	68
III. Resultados e Discussão.....	69
1 Identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos das aduelas de madeira, por HPLC-DAD e LC-MS	69
1.1 Identificação dos principais compostos voláteis da madeira por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	74
2 Índice de Folin Ciocalteu.....	77
3 Avaliação da capacidade antirradicalar e do poder redutor.....	78
3.1 DPPH.....	79
3.2 FRAP	80
Capítulo II.....	83

Caraterização polifenólica de um vinho tinto de mesa em contato com três tipos de aduelas com diferentes graus de queima. Comparação com o estágio em barricas de madeira com graus de tostagem semelhantes.83

I. Introdução	85
1 Transformações dos compostos fenólicos nos vinhos	86
II. Material e Métodos	89
1 Amostras de vinho	89
2 Análises físico-químicas	91
2.1 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)	91
2.2 Índice de Fenóis Totais	91
2.3 Taninos Proantociânicos Totais	91
2.4 Poder Tanante	92
2.5 Índice de Diálise	93
2.6 Análise da Cor	94
2.6.1 Intensidade Corante	94
2.6.2 CIELab.....	95
2.6.3 Análise das Antocianinas	96
2.6.3.1 Antocianinas Livres Totais (método do bissulfito).....	96
2.6.3.2 Quantificação de Antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)	97
2.7 Análise dos Flavan-3-óis	98
2.7.1 Fracionamento de Catequinas e Procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida em coluna de gel Toyopearl HS-40 (s).....	98
2.7.2 Análise de Catequinas e Procianidinas diméricas e oligoméricas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)	98
2.8 Índice de Folin Ciocalteu	99
3 Propriedades Antioxidantes	100
3.1 Capacidade Antiradicalar (DPPH).....	100
3.2 Avaliação do Poder Redutor (FRAP)	100
4 Análise Sensorial.....	100
5 Análise Estatística	101
III. Resultados e Discussão.....	103
1 Análises físico-químicas	103
1.1 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)	103
1.2 Análise dos aldeídos presentes no vinho por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)	107

1.3	Índice de Fenóis Totais	108
1.4	Taninos Proantociânicos Totais	111
1.5	Poder Tanante	114
1.6	Índice de Diálise	116
1.7	Análise da Cor	118
1.7.1	Intensidade Corante	118
1.7.2	CIELab	121
1.7.3	Antocianinas	124
1.7.3.1	Antocianinas Livres Totais	124
1.7.3.2	Antocianinas monoglucósidas	126
1.8	Análise dos Flavan-3-óis	129
1.9	Índice de Folin Ciocalteau	133
2	Análise das Propriedades Antioxidantes	135
2.1	Capacidade Antiradicalar (DPPH)	136
2.2	Avaliação do Poder Redutor (FRAP)	138
3	Análise Sensorial	141
	Conclusão	147
	Bibliografia	151
	Anexos	165

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura do núcleo flavânico.....	26
Figura 2 - Estrutura das principais famílias de flavonóides na natureza.....	27
Figura 3 - Estruturas das unidades monoméricas dos flavan-3-óis (catequinas e galhocatequinas).	28
Figura 4 - Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954a).	29
Figura 5 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.....	30
Figura 6 - Estrutura da procianidina dimérica do tipo A2.....	31
Figura 7 - Estrutura da procianidina trimérica do tipo C1.	31
Figura 8 - Estrutura geral das proantocianidinas polimerizadas (Haslam, 1998).....	32
Figura 9 - Estrutura geral das antocianinas (catião flavílio) presentes na natureza.....	34
Figura 10 - Estrutura das agliconas das principais antocianinas presentes nas espécies <i>Vitis vinífera</i>	35
Figura 11 - Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respectivos ésteres acilados.	35
Figura 12 - Formas de equilíbrio das antocianinas em solução (Brouillard & Lang, 1990).	37
Figura 13 - Equação química que traduz a reação do bissulfito com as antocianinas.	39
Figura 14 - Estruturas gerais dos ácidos benzóicos e cinâmicos.	40
Figura 15 - Estrutura geral dos estilbenos nas uvas.....	42
Figura 16 – Diagrama representativo da composição química da madeira e respectivas percentagens relativas (Mosedale & Puech, 1998).	52
Figura 17 – Estrutura dos aldeídos benzóicos e cinânicos.....	54
Figura 18 – Estrutura dos aldeídos furânicos.....	55
Figura 19 – Soluções extratoras dos três tipos de aparas de madeiras.	60
Figura 20 – Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira (C.O. FOL).	69
Figura 21 – Cromatograma de HPLC-DAD a 280 nm correspondente ao extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira (C.O. FOL).	71
Figura 22 – Histograma referente à composição dos diferentes aldeídos presentes nas aparas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$	73
Figura 23 – Histograma referente aos valores médios de aldeídos presentes nas aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. $**P < 0,01$; $***P < 0.001$	74

Figura 24 - Cromatograma dos compostos voláteis identificados a partir da aduela de madeira tostada ligeiramente (C.O.FOL), obtido por GC-MS.	75
Figura 25 – Histograma referente aos valores médios do índice de folin ciocalteu das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. **P <0,01	78
Figura 26 – Histograma referente aos valores médios da capacidade antiradicalar das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. **P <0,01	79
Figura 27 – Histograma referente aos valores médios do poder redutor das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. *P <0,05; **P <0,01	80
Figura 28 – Cubas de inox com vinho touriga nacional em contato com aduelas de madeira, sujeitas a diferentes queimas; e barricas de madeira, de carvalho francês com diferentes tratamentos térmicos, com o mesmo vinho touriga nacional.....	90
Figura 29- Círculo cromático.	95
Figura 30 – Perfil cromatográfico a 280nm obtido do LC-MS correspondente à amostra de vinho Controlo, ao tempo zero.	104
Figura 31 – Perfil cromatográfico a 280nm obtido do LC-MS, correspondente à amostra de vinho em contato com a aduela de queima forte, e da aduela de madeira de carvalho francês, aos 2 meses de estágio.	107
Figura 32 – Histograma do índice de fenóis totais do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	109
Figura 33 – Histograma do índice de fenóis totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	110
Figura 34 - Histograma do índice de fenóis totais do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	111
Figura 35 – Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	112
Figura 36 - Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	112
Figura 37 - Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	113
Figura 38 – Histograma do poder tanante do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	114
Figura 39 - Histograma do poder tanante do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	115
Figura 40 - Histograma do poder tanante do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	116
Figura 41 – Histograma do índice de diálise do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	116

Figura 42 - Histograma do índice de diálise do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	117
Figura 43 - Histograma do índice de diálise do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	118
Figura 44 – Histograma da intensidade corante do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05	119
Figura 45 - Histograma da intensidade corante do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	120
Figura 46 - Histograma da intensidade corante do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	121
Figura 47 – Gráfico correspondente aos parâmetros a* e b* do vinho controlo, vinho em contato com as diferentes aduelas e vinho estagiado nos cascos.	123
Figura 48 – Histograma das antocianinas livres totais do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	124
Figura 49 - Histograma das antocianinas livres totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	125
Figura 50 - Histograma das antocianinas livres totais do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	126
Figura 51 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes no vinho em contato com aduelas de queima forte e no vinho estagiado no casco 68, aos 0 e 6 meses de estágio.....	127
Figura 52 – Histograma das antocianinas monoméricas do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	128
Figura 53 - Histograma das antocianinas monoméricas do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	128
Figura 54 - Histograma das antocianinas monoméricas do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	129
Figura 55 – Cromatograma de HPLC-DAD correspondente às frações B do vinho em contato com aduelas de queima forte e do vinho estagiado no casco 68, aos 0 e 6 meses de estágio. P <0,05.....	130
Figura 56 – Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	131
Figura 57 - Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas presentes no vinho FOL e no vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	132
Figura 58 - Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas presentes no vinho FOM ⁺ e no vinho do casco 68. P <0,05.....	133

Figura 59 – Histograma do índice de folin ciocalteau do vinho controle e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	134
Figura 60 - Histograma do índice de folin ciocalteau do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	134
Figura 61 - Histograma do índice de folin ciocalteau do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	135
Figura 62 – Histograma da capacidade antiradicalar do vinho controle e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05.....	136
Figura 63 - Histograma da capacidade antiradicalar do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	137
Figura 64 - Histograma da capacidade antiradicalar do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	138
Figura 65 – Histograma do poder redutor do vinho controle e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. P <0,05	139
Figura 66 - Histograma do poder redutor do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05	139
Figura 67 - Histograma do poder redutor do vinho FOM ⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05	140
Figura 68 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da cor.	141
Figura 69 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação olfativa.	142
Figura 70 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação gustativa.	142
Figura 71 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação gustativa, ao nível da sua adstringência.	143
Figura 72 – Resultados obtidos para a classificação geral dos diferentes vinhos.	144

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros definidores do nível de queima (Canas, 2003).	56
Tabela 2 – Padrões de ácido fenólicos comerciais.	61
Tabela 3 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos.	62
Tabela 4 – Padrões de aldeídos comerciais.	63
Tabela 5 – Equações das curvas de calibração de diversos aldeídos.....	63
Tabela 6 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos aldeídos.	64
Tabela 7 – Ácidos e outros compostos fenólicos identificados por LC-MS, na amostra da aduela de madeira de carvalho francês sujeita à queima ligeira (C.O.FOL).	70
Tabela 8 - Aldeídos fenólicos identificados por LC-MS, no extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita à queima ligeira (C.O.FOL).	72
Tabela 9 – Identificação dos compostos voláteis presentes na C.O.FOL, por GC-MS.	76
Tabela 10 – Data das análises químicas.....	90
Tabela 11- Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais.	97
Tabela 12- Gradiente de eluição utilizado na análise das catequinas e das procianidinas diméricas e triméricas.	99
Tabela 13 – Análise química inicial do vinho de mesa tinto de casta Touriga Nacional.	103
Tabela 14 - Dados LC-MS para a amostra Controlo, ao tempo zero.....	105
Tabela 15 - Dados do LC-MS para a amostra de vinho em contato com a aduela de queima forte, aos 2 meses de estágio.	108
Tabela 16 – Parâmetros colorimétricos do vinho Controlo, do vinho em contato com as diferentes aduelas e do vinho estagiado nos cascos.	122
Tabela 17 – Amostras de vinho comparadas em cada série, e seus resultados.	145

Lista de Abreviaturas

a* – Coordenada colorimétrica (Verde - Vermelho)

Abs – Absorvância

b* – Coordenada colorimétrica (Amarelo - Azul)

BSA – Albumina sérica bovina

DAD – Detetor de barra de díodos (Diode array detector)

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

FOL – Aduela de carvalho francês com queima ligeira (French Oak Ligh)

FOM – Aduela de carvalho francês com queima média (French Oak Media)

FOM⁺ – Aduela de carvalho francês com queima forte (French Oak Strong)

FRAP – Capacidade de reduzir o ferro (*Ferric reducing ability power*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (High performace liquid chromatography)

IC – Intensidade corante

I.D – Índice de diálise

IFT – Índice de fenóis totais

L* – Luminosidade

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada e espectrometria de massa

MeOH – Metanol

min – Minutos

MS – Massa do ião principal

MS² – Primeiro fragmento do ião principal

MS³ – Segundo fragmento do ião principal

m/z – Relação massa carga

NTU - Unidades de turbidez (*Nephelometric Turbidity Units*)

P – Nível de significado estatístico

TPA – Taninos proantociânicos totais

UV-Vis – Ultra-violeta/ Visível

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de absorção máximo

ΔC – Diferença da Cromaticidade entre duas amostras

ΔH – Diferença da Tonalidade entre duas amostras

ΔE – Diferença da percepção de duas amostras

Introdução Geral

Os compostos fenólicos ou polifenóis, assim como os alcalóides, os terpenos, os polienos e os poliacetilenos são compostos naturais resultantes do metabolismo secundário das plantas (Beart *et al.*, 1985).

O primeiro grupo é de particular importância fisiológica e morfológica, na medida em intervêm na pigmentação, na regulação do crescimento e da maturação celular, e na defesa contra agentes agressores (Billot, 1983).

Os polifenóis são constituintes importantes dos alimentos (cereais, frutos e seus derivados como é o caso do vinho), estando diretamente relacionados com algumas das suas propriedades organolépticas, como a cor (antocianinas), a adstringência e o amargor (3-flavanóis) (Ribichaud & Noble, 1990; Soares, S. *et al* 2007).

Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas benéficas para a saúde, tais como anti-alérgicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, anti-oxidantes, e efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (Benavente-Garcia, Castillo, Marin, Ortuno, e Del Rio, 1997; Manach, Mazur, e Scalbert, 2005; Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000; Puupponen-Pimia" *et al.*, 2001; Samman, Lyons Wall, & Cook, 1998). Nos últimos anos, vários estudos associaram o consumo de alimentos ricos em polifenóis com a prevenção de doenças cardiovasculares (Block, 1992; Hertog *et al*,1993), certos tipos de cancro e outras doenças relacionadas com a idade (Rice-Evans & Packer, 1998; Pratt, 1992); sendo que este efeito preventivo depende sempre da composição de compostos fenólicos e das suas concentrações relativas nos alimentos. Os efeitos benéficos derivados de compostos fenólicos têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante (Heim, Tagliaferro, e Bobilya, 2002), à capacidade que estes compostos têm de inibir a ação de espécies reativas de oxigénio que são responsáveis por doenças resultantes do stress oxidativo (Masquellier, 1982; Ricardo da Silva *et al.*, 1991; Teissedre *et al.*, 1996).

Durante o processo de maturação e envelhecimento do vinho, os compostos fenólicos (nomeadamente as antocianinas e os 3-flavanóis) sofrem várias transformações químicas que originam novos compostos, mais estáveis, com características físico-químicas distintas dos seus precursores, contribuindo assim para a alteração das características organolépticas como a cor e o sabor do vinho (Jurd, 1969; Somers, 1971; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Pissarra *et al.*, 2003). Deste modo, observa-se o importante papel que os flavanóis e as antocianinas desempenham na qualidade dos vinhos tintos.

Do ponto de vista estrutural, os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um sistema benzénico com um ou mais grupos hidroxilo, que por sua vez se podem encontrar metilados ou glicosilados. Podem ser classificados em dois grandes grupos, os

flavonóides, dos quais fazem parte os flavan-3-óis, os flavonóis, as flavanonas, as flavonas, as isoflavonas, as chalconas e as antocianinas; e os não-flavonóides que incluem os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e outros derivados fenólicos como lenhinas e estilbenos (*e.g.* resveratrol).

1 Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, cuja estrutura fundamental é constituída por uma configuração C6-C3-C6 formada por dois anéis aromáticos (A e B), que se encontram ligados por um anel heterocíclico pirânico (C) (Zoecklein *et al.*, 1995) (Figura 1).

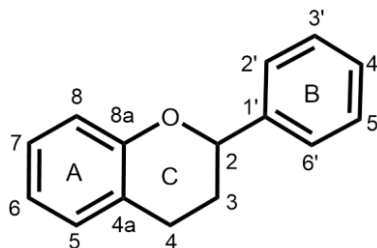


Figura 1 – Estrutura do núcleo flavânico.

Esta classe de compostos fenólicos pode dividir-se em várias famílias de compostos como os flavanóis, os flavonóis, os flavanonóis, as flavonas, as flavanonas e as antocianidinas, que se distinguem pelo grau de oxidação (grau de insaturação) do anel pirânico C (Figura 2).

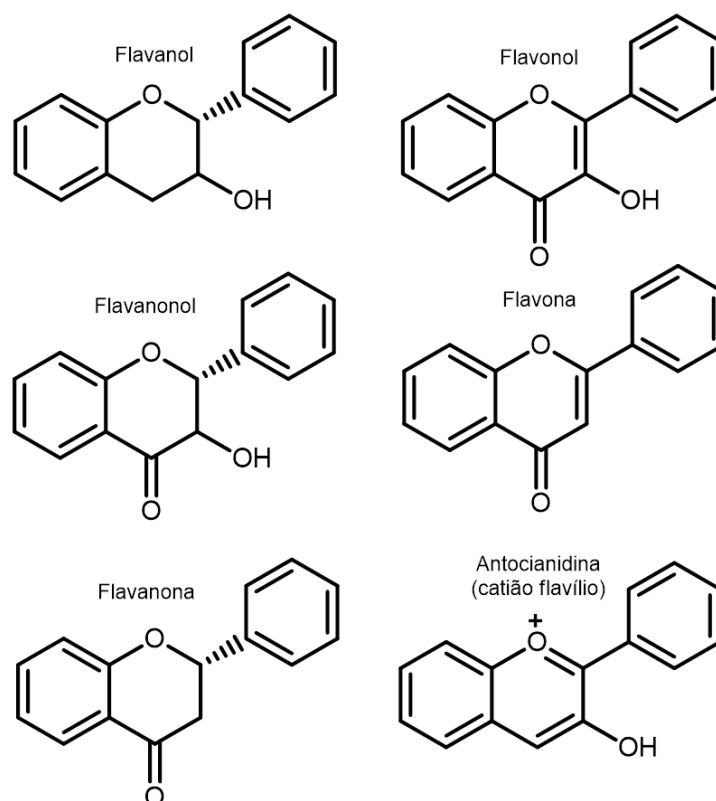


Figura 2 - Estrutura das principais famílias de flavonóides na natureza.

1.1 Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis e os seus derivados estruturais, as proantocianidinas ou taninos condensados são caracterizados por um núcleo flavânico constituído por dois anéis aromáticos (A e B) e por um anel heterocíclico pirânico C, ao qual se encontra ligado um grupo hidroxilo na posição 3 do anel C.

Os flavan-3-óis existentes na natureza apresentam várias formas de estrutura que diferem na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel pirânico C (C2 e C3) bem como no grau de hidroxilação dos anéis A e B. Os flavan-3-óis mais comuns no reino vegetal e particularmente no género *Vitis vinifera*, encontram-se hidroxilados nas posições C5 e C7 do anel A, variando apenas no número de grupos hidroxilo no anel B e na estereoquímica do carbono 3 do anel C. Este tipo de compostos podem ser classificados como catequinas e galhocatequinas. As catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) encontram-se hidroxilados nas posições 3' e 4' do anel B, enquanto que as galhocatequinas ((+)-galhocatequinas e (-)-epigalhocatequinas) se encontram hidroxiladas nas posições C3', C4' e C5' do anel B (Figura 3).

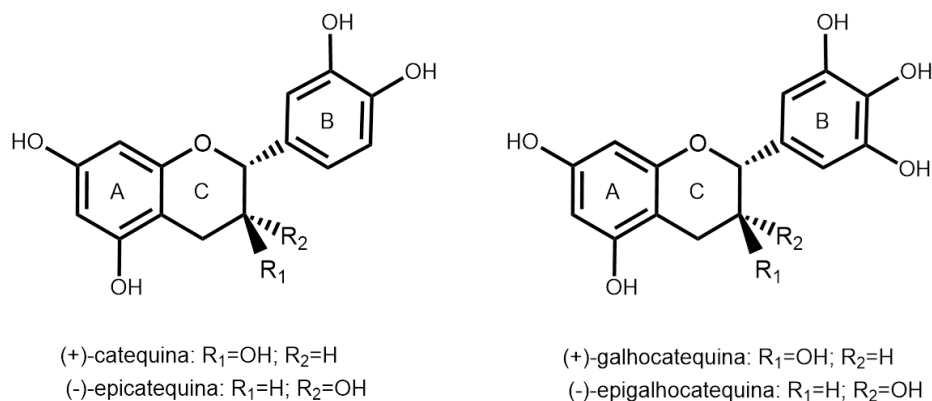


Figura 3 - Estruturas das unidades monoméricas dos flavan-3-óis (catequinas e gallocatequinas).

Os flavan-3-óis podem ainda encontrar-se esterificados com o ácido gálico ou com uma glicose na posição O-3 do anel pirânico C (Piretti *et al.*, 1976; Lee & Jaworski, 1990), embora a forma glicosilada seja pouco comum no reino vegetal (Porter, 1988).

1.1.1 Proantocianidinas

Na natureza, bem como no vinho, os flavan-3-óis existem também sob formas mais polimerizadas, denominadas de proantocianidinas ou taninos condensados.

As proantocianidinas por aquecimento em meio ácido decompõem-se e dão origem a antocianidinas (cianidina e/ou delphinidina) mediante a rutura das ligações entre as unidades monoméricas, de acordo com o mecanismo descrito na literatura (Bate-Smith, 1954a) (Figura 4).

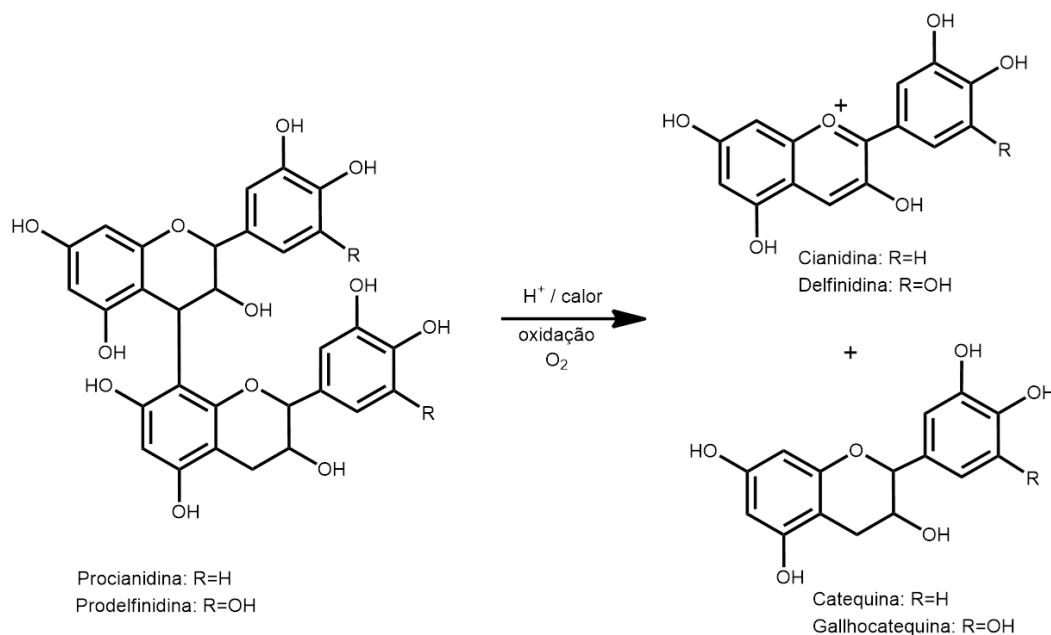
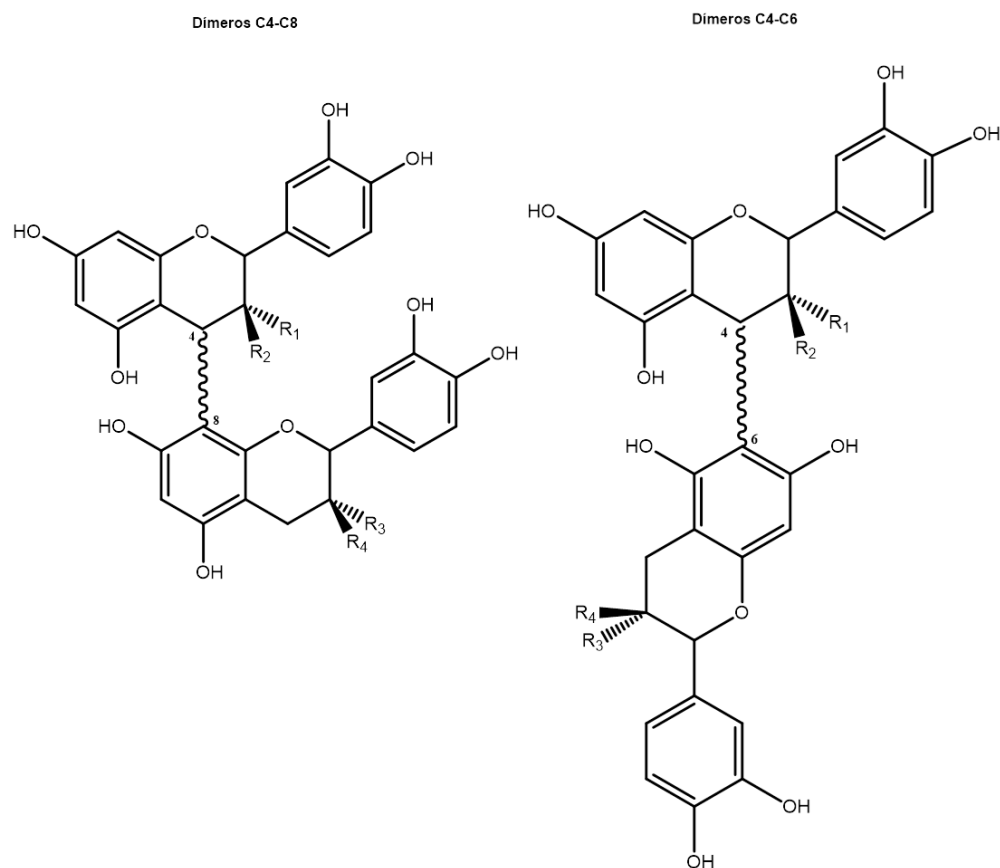


Figura 4 - Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954a).

A diversidade estrutural das proantocianidinas ou taninos condensados resulta da natureza das unidades monoméricas constituintes (as procianidinas são constituídas por catequinas, enquanto que as prodelfinidinas são constituídas por galhocatequinas), do tipo de ligação interflavanólica entre estas unidades (como as ligações C4-C6 e C4-C8 características das procianidinas diméricas do tipo B), e do seu grau de polimerização (dímeros, trímeros, oligómeros e polímeros) (Bate-Smith, 1954; Haslam, 1996).

O tipo de ligação estabelecida entre as unidades monoméricas é designado por uma letra (A, B, C e D) e por um algarismo para identificar cada isómero dentro de cada um dos grupos (Weinges *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1972). Assim, as procianidinas diméricas do tipo B resultam da condensação de duas unidades flavanólicas (combinação de (+)-catequina e (-)-epicatequina) através de uma ligação entre o carbono 4 do monómero superior com o carbono 6 ou 8 da unidade inferior (Figura 5).



R1	R2	R3	R4	Dímeros C4-C8	Dímeros C4-C6
OH	H	H	OH	B1	B5
OH	H	OH	H	B2	B6
H	OH	H	OH	B3	B7
H	OH	OH	H	B4	B8

Figura 5 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.

As procianidinas diméricas do tipo A, para além de apresentarem uma ligação interflavanólica do tipo B, possuem ainda uma ligação éter entre o carbono 2 do monómero superior e o grupo hidroxilo do carbono 5 ou 7 da unidade inferior (Salagoity-Auguste & Bertrand, 1984) (Figura 6).

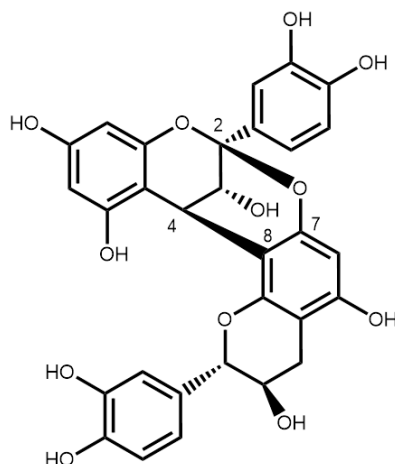


Figura 6 - Estrutura da procianidina dimérica do tipo A2.

As procianidinas triméricas podem ser divididas em dois grupos: as procianidinas triméricas do tipo C, cujas ligações interflavanólicas são do tipo B (Figura 7) e as procianidinas triméricas do tipo D, que possuem uma ligação interflavanólica do tipo B e outra do tipo A.

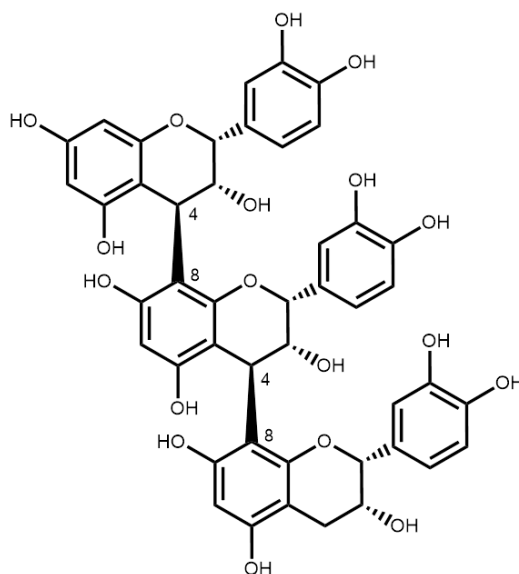


Figura 7 - Estrutura da procianidina trimérica do tipo C1.

As proantocianidinas existentes na natureza encontram-se maioritariamente nas suas formas mais polimerizadas (oligómeros e polímeros), formando complexos moleculares de maiores dimensões (Haslam, 1998) (Figura 8).

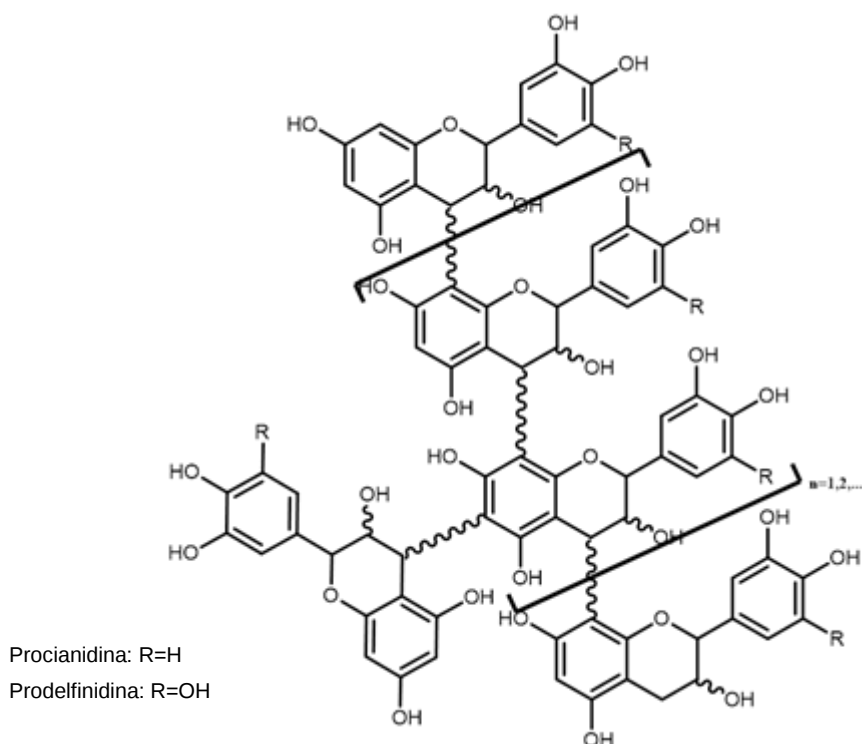


Figura 8 - Estrutura geral das proantocianidinas polimerizadas (Haslam, 1998).

As principais proantocianidinas existentes nas uvas e nos vinhos são especialmente procianidinas, ou seja oligómeros e polímeros de catequina e epicatequina unidas por ligações C_4-C_8 e em menor quantidade por ligações C_4-C_6 (Ricardo da Silva, 1995). Recentemente foram encontrados pela primeira vez, dímeros e trímeros de prodelfinidinas num vinho de mesa tinto, da Região Demarcada dos Vinhos Verdes (Sub-região Lima), produzido a partir de castas tintureiras (Teixeira, N. *et al.*, 2016).

1.1.2 Propriedades dos Taninos

Os taninos constituem o terceiro grupo mais importante dos compostos fenólicos (Porter, 1989). Estes podem ser classificados em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis. Os primeiros assumem um importante papel ao nível das propriedades gustativas dos alimentos e especificamente dos vinhos uma vez que têm a capacidade de interagir com as proteínas da saliva, formando complexos estáveis que provocam a diminuição da lubrificação do palato, causando uma sensação de secura em toda a boca, denominada por adstringência (Bate-Smith, 1973; Haslam & Lilley, 1988; Allen, 1994). Estes compostos podem ainda atuar ao nível da cor, devido à sua associação com as antocianinas durante o processo

maturação/envelhecimento dos vinhos, através de fenómenos de co-pigmentação (Michaud *et al.*, 1971; Czochanska *et al.*, 1979; Lee & Jaworki, 1989; Prieur *et al.*, 1994; de Freitas, 1995; Dallas *et al.*, 1996a, b; Moutounet *et al.*, 1996).

Os taninos hidrolisáveis são constituídos por uma molécula de açúcar, geralmente a β -D-Glucose, ligada a um composto fenólico, principalmente o ácido gálgico (taninos gálgicos) ou o ácido elágico (taninos elágicos) (Barquette & Trione, 1998). Estes compostos são facilmente hidrolisáveis por via enzimática ou em condições ácidas ou básicas, dando origem ao ácido gálgico (taninos gálgicos) e ácido elágico (taninos elágicos) (Chen, 1970; Vivas *et al.*, 1996), respetivamente.

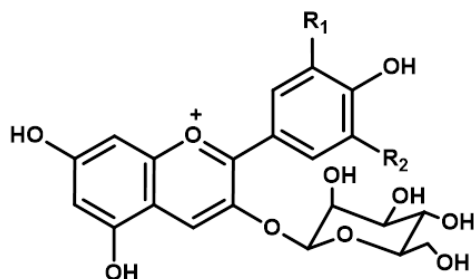
O ácido elágico, que eventualmente se encontra presente no vinho, não aparece naturalmente das uvas, a sua presença no vinho é de origem exógena como resultado de certas práticas vinícolas, tais como a utilização de barricas ou chips, cuja madeira seja rica neste tipo de taninos; ao passo que o ácido gálgico, tem origem das películas ou das grainhas.

Durante o processo de conservação e envelhecimentos dos vinhos, ocorrem modificações no estado de condensação dos taninos, influenciando desta forma a sua cor e as suas características organoléticas.

1.2 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais responsáveis por uma vasta gama de cores em vegetais, frutas e outros produtos derivados. (Heredia *et al.*, 1998). Estas são também responsáveis pela coloração dos vinhos tintos e das uvas, estando localizadas na película e na polpa das castas tintureiras (Ribéreau-Gayon, 1964).

Estruturalmente as antocianinas correspondem a glicósidos do catião flavílio, polihidroxilados e/ou metoxilados nos anéis A e B (Figura 9).



Antocianidina	R ₁	R ₂
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 9 - Estrutura geral das antocianinas (catião flavílio) presentes na natureza.

As antocianinas podem ainda diferir entre si pelo número, natureza e posição dos açúcares ligados à molécula; e pelo número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas na molécula de açúcar (Guerra, 1997). Maioritariamente os açúcares ligam-se na posição O-3, podendo também estabelecer ligação em O-5 e, em alguns casos em O-7. Os açúcares mais comuns são a glucose, a ramnose, a galactose, a xilose e a arabinose (Francis, 1989) e estes podem apresentar-se sob a forma de mono, di e trissacáridos.

As formas agliconas (não-glicosiladas) das antocianinas denominadas de antocianidinas são relativamente instáveis em soluções aquosas e muito menos solúveis que as antocianinas (Timberlake & Bridle, 1966), por isso a glicosilação confere uma maior estabilidade e solubilidade a estes pigmentos. A delfinidina, a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina são as formas agliconas correspondentes às antocianinas presentes na espécie *Vitis vinifera* (Figura 10). Estes pigmentos diferem no seu padrão de hidroxilação e metoxilação, no qual resulta a alteração da cor desde o laranja-avermelhado até ao violeta-azulado, a um pH ácido. De um modo geral, a hidroxilação do anel B induz desvios batocrómicos (deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda máximo superior), ao passo que a metilação dos grupos hidroxilo inverte esta tendência, induzindo a desvios hipsocrómicos (Brouillard, 1983; Stintzing & Carle, 2004).

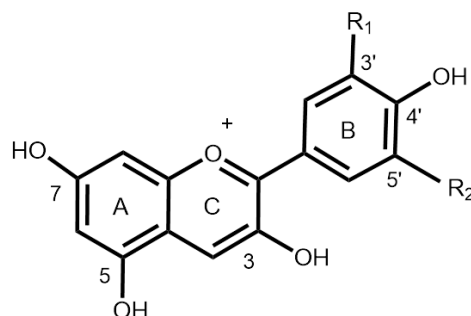


Figura 10 - Estrutura das agliconas das principais antocianinas presentes nas espécies *Vitis vinífera*.

As antocianinas da espécie *Vitis vinífera* são constituídas quase exclusivamente por monoglucosídeos. Pelo contrário, as espécies americanas, como *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* e seus híbridos são constituídos por diglucosídeos e têm antocianinas esterifiadas com alguns ácidos, nomeadamente o ácido acético, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico (Figura 11) (Cardoso, A., 2007).

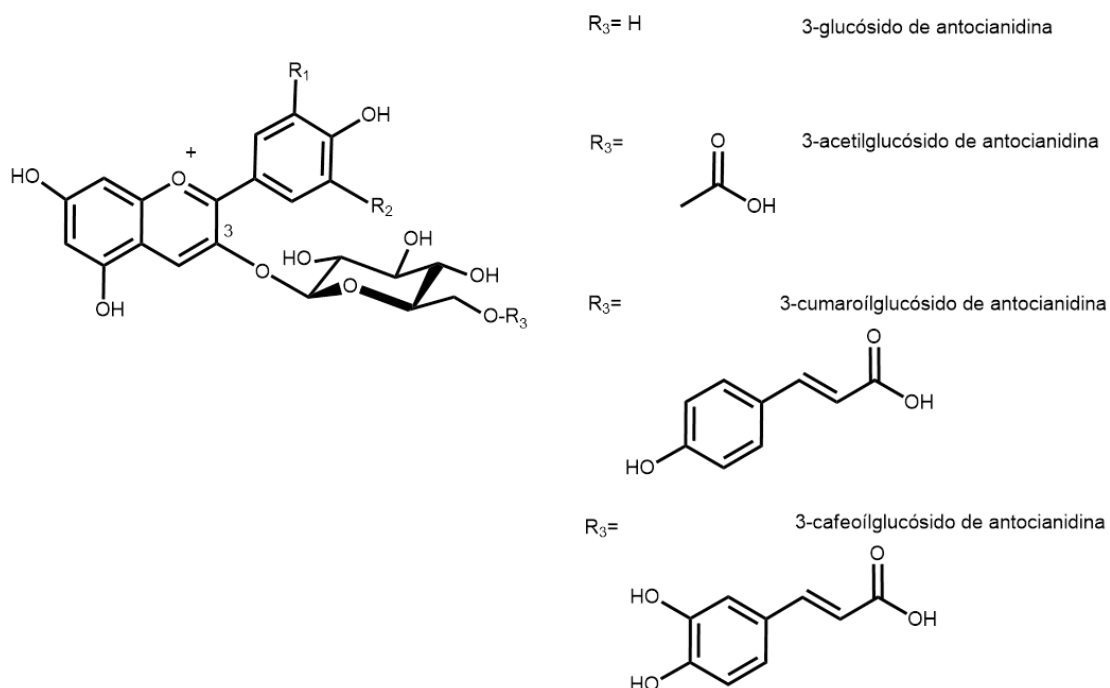


Figura 11 - Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respetivos ésteres acilados.

As plantas que contêm antocianinas exibem uma série de cores que não podem ser simplesmente explicadas pelo conteúdo antociânico. É necessário considerar outros parâmetros do meio, como a influência do pH, fenómenos de auto-associação e de copigmentação (Brouillard & Lang, 1990).

1.2.1 Formas de equilíbrio das antocianinas

De acordo com o pH em solução, as antocianinas podem existir sob diversas formas de equilíbrio. A pH 1, as antocianinas encontram-se maioritariamente na forma de catião flavílio (AH^+) e apresentam uma cor vermelha. Com o aumento do pH, ocorre a hidratação do catião flavílio levando ao aparecimento da forma de base carbinol incolor (B). A partir de valores de pH 2 começam a surgir as formas de chalcona de cor amarela (C) e a proporção de catião flavílio diminui bruscamente, traduzindo-se numa diminuição considerável da cor vermelha em solução. A pH entre 3 e 4, a forma predominante é a base carbinol incolor (B), embora todas as outras formas de equilíbrio se encontrem presentes. Também entre os valores de pH 4 e 7 predomina a forma de base carbinol incolor (B), sendo a fração molar do catião flavílio insignificante. A pH neutro ou alcalino ocorre uma desprotonação rápida do catião flavílio originando a base quinoidal violeta (A) (Figura 12).

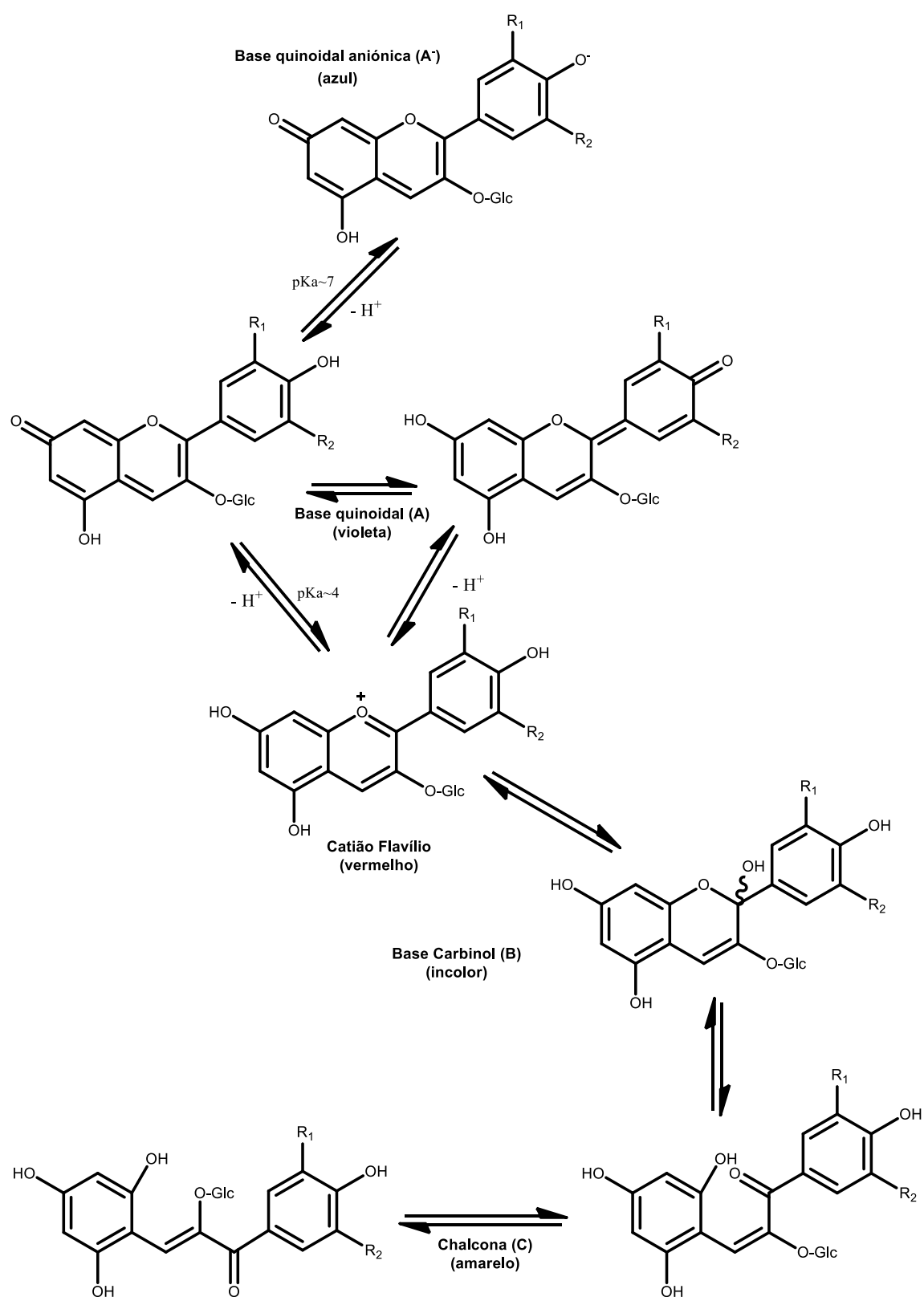


Figura 12 - Formas de equilíbrio das antocianinas em solução (Brouillard & Lang, 1990).

Há outros parâmetros que influenciam a estabilidade das antocianinas, sendo eles a temperatura, a luz, o oxigénio e a presença de metais. Metais como o Fe, Al, Cu, Sn e Mg, formam complexos de coordenação corados bastante estáveis com as antocianinas que possuam mais do que um grupo hidroxilo no anel B (delfinidina, petunidina e a cianidina). No caso dos vinhos, o pH encontra-se compreendido entre 3,5 e 4,0, o que significa que as antocianinas se encontram predominantemente nas suas formas de hemiacetal incolor (Brouillard & Lang, 1990) e portanto a predominância da cor vermelha no vinho, deve-se à estabilização da forma de catião flavílio através de diferentes mecanismos (nomeadamente o da copigmentação).

1.2.2 Copigmentação

O fenómeno de copigmentação consiste numa interação molecular através de pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas não coradas, tais como flavonóides (particularmente os flavonóis), ácidos fenólicos, alcalóides, aminoácidos e ácidos orgânicos, que atuam como copigmentos (Davies & Mazza, 1993).

A copigmentação leva à formação de um complexo em que existem interações entre diferentes sistemas π (sistema rico em eletrões de diferentes copigmentos com um sistema deficiente em eletrões da antocianina), promovendo a proteção da antocianina do ataque nucleofílico da água levando a uma maior estabilização.

Do fenómeno de copigmentação resulta uma intensificação da cor (efeito hiperocrómico) que poderá ser acompanhada por um deslocamento do comprimento de onda máximo para valores superiores (efeito batocrómico).

Assim, para além do pH, também as interações moleculares das antocianinas com outros compostos afetam a estabilidade das antocianinas, contribuindo desta forma para a enorme variedade de cores que estes pigmentos exibem (Heredia *et al.*, 1998).

Em vinhos jovens, 30 a 50% da cor pode ser atribuída a efeitos de copigmentação (Boulton, 2001).

1.2.3 Reacção das antocianinas com bissulfito

Um dos produtos que é utilizado na produção dos vinhos, com efeito antioxidante e inibitório do crescimento de microrganismos indesejados, é o dióxido de enxofre (SO₂). Este quando adicionado antes da fermentação possibilita o aumento da extração da cor das películas e estabiliza a cor quando adicionado durante o processo de engarrafamento. Este fenómeno é conseguido devido à formação de compostos estáveis e incolores através de uma reacção reversível (

Figura 13) (Timberlake & Bridle, 1966).

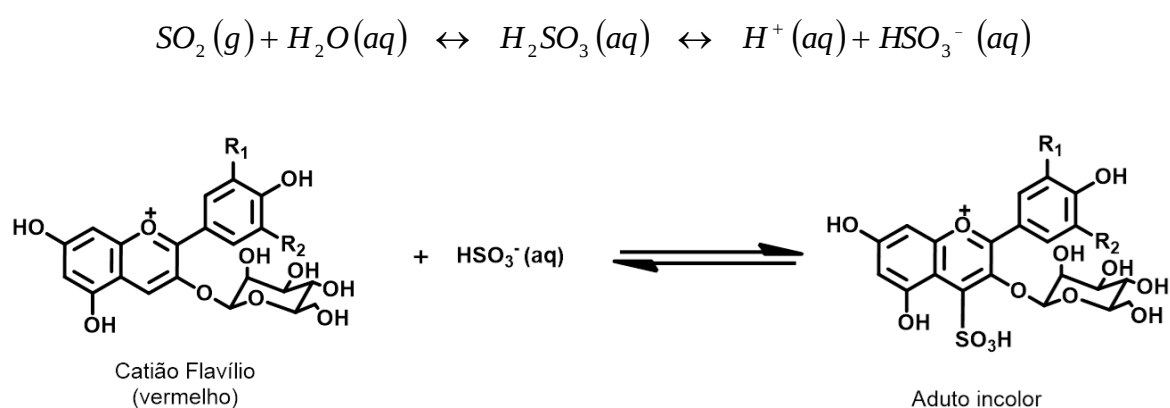


Figura 13 - Equação química que traduz a reacção do bissulfito com as antocianinas.

Em solução aquosa, o dióxido de enxofre (SO₂) dá origem ao anião bissulfito (HSO₃⁻) que se liga rapidamente ao catião flavílio na posição C4, de um modo reversível, originando um aduto incolor.

O bissulfito pode também estabelecer ligação na posição C2 da antocianina resultando igualmente numa estrutura incolor. Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação do catião flavílio, acidifica-se a solução de modo a que esta volte a adquirir cor vermelha.

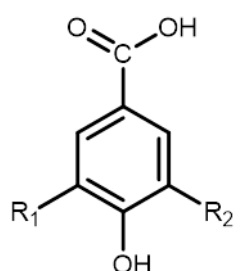
Pequenas quantidades de SO₂ podem descorar grandes quantidades de antocianinas, uma vez que as constantes de equilíbrio desta reacção são elevadas (Timberlake & Bridle, 1966). Contrariamente às antocianinas livres ou simples, as antocianinas polimerizadas não descoloram com a adição de bissulfito de sódio (Dallas & Laureano, 1994).

2 Não-Flavonóides

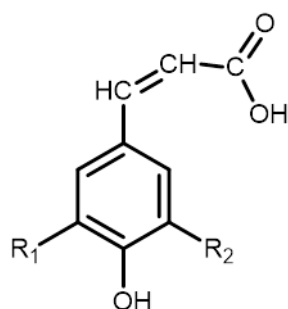
Os compostos não-flavonóides são um grupo vasto de compostos fenólicos simples que podem influenciar o sabor amargo e o aroma dos vinhos. A este grupo pertencem os ácidos fenólicos, os estilbenos e as isoflavonas.

2.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são fenóis monoméricos incolores, que compreendem os ácidos benzóicos e cinâmicos (Figura 14). Estes ácidos encontram-se em frutos na sua forma livre, e encontram-se em baixas concentrações quando comparados com as suas formas conjugadas (Clifford 1997). Estes ácidos, aparecem numa variedade de produtos, de entre os quais, películas de uvas, maioritariamente sob a forma de ésteres com ácido tartárico ou ligados a açúcares (Michael, 1999).



Ácido benzóico	R ₁	R ₂
<i>p</i> -hidroxibenzóico	H	H
Protocatechuico	OH	H
Vanílico	OCH ₃	H
Gálgico	OH	OH
Siríngico	OCH ₃	OCH ₃



Ácido cinâmico	R ₁	R ₂
<i>p</i> -cumárico	H	H
Cafeico	OH	H
Ferrúlico	OCH ₃	H
Sinápico	OCH ₃	OCH ₃

Figura 14 - Estruturas gerais dos ácidos benzóicos e cinâmicos.

Os ácidos fenólicos que se encontram em maior quantidade nas uvas são os ácidos hidroxicinâmicos (derivados do ácido cinâmico). A sua importância prende-se com os

fenómenos de acastanhamento oxidativo que os mostos ou vinhos brancos podem sofrer (Singleton, 1987). Estes compostos, ricos em grupos hidroxilos, na presença de oxigénio e da enzima tirosinase são oxidados, dando origem às respectivas quinonas. Estas quinonas, altamente reativas, envolvem-se em diversas reações que conduzem ao aparecimento de compostos, com colorações que variam do amarelo ao castanho, nos mostos e vinhos brancos.

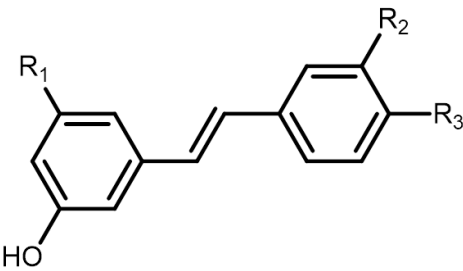
2.2 Estilbenos

Os estilbenos podem ser encontrados nas células das películas e nos sarmentos das videiras, apresentando uma ação antioxidante, anti-inflamatória e quimio-preventiva para alguns tipos de cancro.

Geralmente, o anel A destes compostos possui dois grupos hidroxilo na posição *meta*, enquanto o anel B está substituído por grupos hidroxilo e/ou metoxilo nas posições *orto*, *meta* e/ ou *para* (Figura 15). Quase todos os estilbenos possuem duas formas isoméricas (*cis* e *trans*), sendo a forma *trans* a mais estável.

Um dos compostos pertencentes a este grupo é o resveratrol (*trans*-3,5,4- tri-hidroxi-estilbeno), elemento mais abundante desta família em uvas e amendoins (Cassidy *et al.* 2000), que se apresenta como sendo uma fitoalexina, componente este que é sintetizado pela videira em resposta a situações de stress, como o ataque de patógenos/ infeções fúngicas ou a incidência de luz ultravioleta (UV) (Longcake & Pryce, 1977; Hart, 1981; Jeandet *et al.*, 1991; Korhammer *et al.*, 1995).

O resveratrol encontra-se nos vinhos em concentrações muito reduzidas. Este tipo de substância concentra-se nas células da película da uva, e portanto, quanto maior for o processo de maceração pelicular, maior será a quantidade deste tipo de compostos extraídos. Assim, o facto de os vinhos tintos apresentarem concentrações mais elevadas, deste tipo de compostos, em relação aos vinhos brancos, deve-se a este fenómeno e às distintas tecnologias de vinificação.



Estilbeno	R ₁	R ₂	R ₃
Resveratrol	OH	H	OH
Resveratrolósido	OH	H	O-glucósido
Picetanol	OH	OH	OH
Astringina	OH	OH	O-glucósido

Figura 15 - Estrutura geral dos estilbenos nas uvas.

Objetivo

O presente trabalho, teve como objetivo principal compreender a influência dos diferentes tratamentos térmicos da madeira de carvalho francês na composição polifenólica, nas propriedades antioxidantes e na qualidade de um vinho de mesa tinto monovarietal – Touriga Nacional, produzido pela Empresa Gran Cruz, na Região Demarcada do Douro; durante um período de estágio de 6 meses.

Para tal, realizaram-se 2 ensaios, no primeiro colocou-se o vinho em contato com os três tipos de aduelas com os diferentes graus de queima, e no segundo o mesmo vinho foi colocado em contato com cascos/barricas com graus de queima semelhantes.

Para ambos os ensaios, efetuaram-se diferentes análises físico-químicas com o objetivo de caracterizar os principais compostos fenólicos, presentes nas madeiras e nos vinhos em estudo.

Com o propósito de avaliar a existência de diferenças qualitativas nos diferentes vinhos, recorreu-se a um painel de provadores, onde se avaliaram sensorialmente os vinhos que estiveram em contato com as aduelas e barricas sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos.

Descrição do Trabalho

Este trabalho incidiu no estudo da composição fenólica de aduelas de madeira de carvalho francês com três queimas diferentes e, no estudo do perfil polifenólico do vinho em contato com os três tipos de aduelas com diferentes tostas ao longo do tempo de envelhecimento por um período de seis meses.

Neste sentido, o trabalho foi dividido em dois capítulos:

Capítulo I: Identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas aduelas de carvalho francês sujeitas a diferentes tratamentos térmicos – onde se começou por avaliar os principais ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos das respetivas aduelas de madeira, utilizando soluções modelo de vinho.

Capítulo II: Caracterização polifenólica de um vinho tinto de mesa em contato com três tipos de aduelas com diferentes graus de queima. Comparação com o estágio em barricas de madeira com graus de tostagem semelhantes – onde se realizou o estudo da composição das antocianinas e dos flavan-3-óis, e se avaliou as propriedades antioxidantes dos vinhos em contato com as diferentes aduelas, ao tempo 0, 2º, 4º e 6º mês. Para as amostras de vinho estagiados nas barricas, procedeu-se igualmente aos mesmos estudos referidos anteriormente, com a única diferença nos tempos avaliados, tempo 0 e 6º mês.

Capitulo I

Identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas aduelas de madeira de carvalho francês sujeitas a diferentes tratamentos térmicos.

I. Introdução

A utilização da madeira no setor vitivinícola associada à elaboração, conservação, mas sobretudo ao transporte dos vinhos é uma prática já bastante antiga. Desde cedo se reconheceu a importância da influência da madeira, na qualidade dos produtos enológicos.

O relacionamento das práticas enológicas com as práticas da tanoaria permitiu obter um conhecimento mais aprofundado sobre as características e o comportamento das madeiras, levando a uma diferenciação da sua utilização.

A qualidade da madeira depende de várias propriedades específicas, nomeadamente da espécie botânica, da origem geográfica, da variabilidade da composição anatómica, da composição química, assim como do tratamento térmico realizado na indústria de tanoaria vulgarmente denominado por “queima” (Cérdan *et al.*, 2006).

Uma das principais características que a madeira adequada a fins enológicos deverá ter é uma porosidade ligeira, sendo permeável à passagem de gases, especialmente oxigénio, que está envolvido nas reações de oxidação e noutros processos físico-químicos que ocorrem durante o processo de envelhecimento. Porém, a madeira deverá também apresentar uma composição química adequada, para que além de influenciar as propriedades como a permeabilidade, a durabilidade e a dureza, contribua para a obtenção de produtos enológicos com as propriedades organoléticas e físico-químicas desejadas (Keller, 1987; Feuillat & Keller, 1997). Uma vez que nem todas as madeiras apresentam as características mais adequadas para esta finalidade, ocorreu um progressivo abandono destas, elegendo-se a madeira de carvalho como a madeira de excelência, com uma reconhecida influência positiva sobre a qualidade dos vinhos (Dubois, 1989; Moutounet *et al.*, 1999).

O carvalho mais utilizado em tanoaria insere-se no género *Quercus* L., encontrando-se as diferentes espécies, classificadas em dois subgéneros: *Cyclobalanopsis* (madeira vermelha) típica das regiões tropicais e subtropicais; *Euquercus* (madeira branca) difundida por todo o mundo.

É do subgénero *Euquercus* que surgem as três espécies com maior valor comercial em tanoaria, nomeadamente, *Q. robur*, *Q. sessiliflora* e *Q. alba*. A espécie *Q. robur* é a que ocupa a maior área na Europa e que constitui a mais importante fonte de madeira para a tanoaria (Kleinschmit, 1993; Mosedale *et al.*, 1999). No entanto, mesmo considerando a mesma espécie, é fundamental ter em conta a variabilidade da madeira, uma vez que influencia decisivamente o seu comportamento tecnológico em tanoaria e o resultado do envelhecimento de produtos enológicos.

Na Europa, as áreas mais importantes de floresta de carvalho encontram-se em França, nas regiões de Limousin, Argonne, Borgogne e Vosges (Chatonnet, 1995). Estas florestas apresentam condições particulares para a produção de madeira de carvalho, o chamado Carvalho Francês, que pela sua qualidade é uma mais-valia para o vinho. É mais suave, com aromas e sabores mais finos, destacando-se as especiarias e dá uma maior estrutura e longevidade ao vinho.

Na América do Norte, a espécie do subgénero *Euquercus* que apresenta uma maior aptidão em tanoaria e que representa a maior área de ocupação e maior utilização é, o *Q. alba*. Esta madeira destaca-se pela abundância de compostos aromáticos, nomeadamente com notas de côco muito próprias, acompanhada pela escassez de compostos fenólicos, proporcionando vinhos mais suaves no final do estágio.

Em Portugal as principais áreas de carvalho encontram-se na Beira Interior, Trás-os-Montes e Gerês, sendo as espécies mais importantes para a tanoaria o *Q. pyrenaica* e o *Q. fagine*, pertencentes ao subgénero *Euquercus*. O *Q. pyrenaica* apresenta teores mais elevados de substância extraíveis e de taninos elágicos que as espécies francesas, sendo tradicionalmente utilizado no envelhecimento de aguardentes.

1 Aduelas de madeira de carvalho

O estágio de vinhos em barricas de madeira de carvalho considera-se uma prática indispensável para a elaboração de vinho tintos de qualidade. A madeira de carvalho conduz a alterações no vinho ao nível da cor, estrutura e principalmente do aroma, uma vez que durante este período ocorrem diferentes reações entre os compostos fenólicos presentes na madeira e diversos compostos do vinho. Todo este processo apresenta uma elevada durabilidade, retardando o momento em que os vinhos são lançados no mercado.

Algumas das particularidades das barricas de madeira são o facto de serem dispendiosas, ocupam bastante espaço na adega e apresentam uma vida útil limitada; sendo a principal fonte de microrganismos indesejáveis, como é o caso da *Brettanomyces bruxellensis*. Esta levedura desenvolve-se em qualquer momento da vida de um vinho, especialmente durante a fase de estágio, sendo responsável pela produção de compostos do aroma indesejáveis (GardeCerdán & Ancín-Azpilicueta 2006; Guchu *et al.*, 2006); Bautista-Ortín *et al.*, 2008; PérezMagariño *et al.*, 2009; Petruzzi *et al.*, 2012). Deste modo, os produtores de vinho têm vindo a procurar alternativas que possam acelerar este processo, tendo em vista a obtenção de vinhos mais económicos e com

caraterísticas de madeira similares às das barricas onde geralmente envelhecem os vinhos.

Países como Austrália, Estados Unidos da América, Chile, entre outros, que não pertencem à União Europeia e que não têm regulamentos restritivos na indústria do vinho, introduziram no mercado vinhos macerados com aduelas de madeira de carvalho como alternativa ao envelhecimento tradicional em barricas de madeira de carvalho (Bautista-Ortín *et al.*, 2008; Pérez-Magariño *et al.*, 2009; Prieto *et al.*, 2012; Chira & Teissedre, 2013). Após alguns anos de controvérsia, a União Europeia aprovou em Outubro de 2006 a utilização de pedaços de madeira de carvalho e regulamentou a designação e apresentação destes mesmos vinhos (Bautista-Ortín *et al.*, 2008; Pérez-Magariño *et al.*, 2009; Chira e Teissedre, 2013).

As aduelas de madeira de carvalho são utilizadas na elaboração e afinação de vinhos, podendo também serem incluídas durante o processo de fermentação dos mostos, de forma a transmitir ao vinho certos componentes da madeira de carvalho (Guchu *et al.*, 2006; García-Carpintero *et al.*, 2012). As aduelas podem ser deixadas no estado natural ou serem tratadas termicamente com vários graus de queima: ligeira, média ou forte.

O aumento na utilização de aduelas de madeira de carvalho relaciona-se principalmente com os baixos investimentos, a obtenção de resultados sensoriais semelhantes num curto espaço de tempo, simplicidade de uso e a possibilidade de prevenir contaminações (Cabrita *et al.*, 2012).

Vários estudos têm sido feitos, de forma a perceber as diferenças entre os vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho e os vinhos produzidos com aduelas de madeira de carvalho, de diferentes origens geográficas e com diferentes níveis de tosta (Álamo *et al.*, 2008; Pérez-Magariño *et al.*, 2009). Segundo Frangipane *et al.* (2007) a origem geográfica da madeira apresenta uma maior influência nas caraterísticas de vinhos envelhecidos em barricas do que em vinhos produzidos com aduelas; ao passo que o estudo realizado por Sanza e Domínguez (2006) demonstra que o vinho envelhecido em contato com aduelas de madeira de carvalho realiza-se num menor espaço de tempo, em comparação com o envelhecimento em barricas.

2 Composição química da madeira

A madeira é muito heterogénea e apresenta grande variabilidade química que depende da espécie botânica, das práticas silvícolas e principalmente da estrutura anatómica da madeira (Severo *et al.*, 2006).

Os compostos da madeira são normalmente divididos em dois grandes grupos: compostos de massa molecular elevada ou macromoleculares, essencialmente constituídos por celulose, hemicelulose, lenhina, proteínas e pectinas, que se encontram em todos os componentes da madeira; e os compostos de massa molecular baixa, ainda divididos por compostos orgânicos (extrativos) e compostos inorgânicos (cinzas), que se encontram em proporções variáveis dependendo da espécie (Haluke & Irmouli, 1998; Fengel & Wegener, 1989; Vivas 2000) (Figura 16).

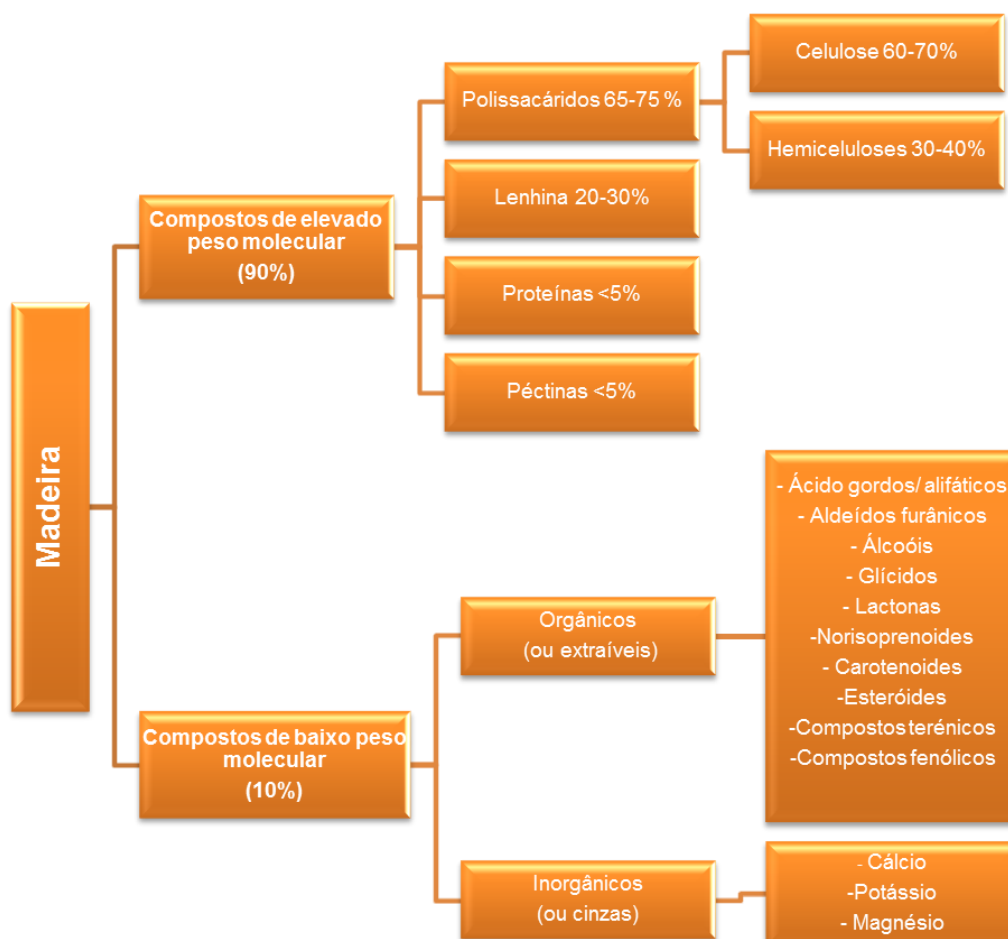


Figura 16 – Diagrama representativo da composição química da madeira e respectivas percentagens relativas (Mosedale & Puech, 1998).

2.1 Compostos de baixo peso molecular

Os compostos de baixa massa molecular presentes na madeira pertencem a várias e diversas famílias químicas, tornando a sua classificação num processo complexo (Freitas *et al.*, 2005).

Estes compostos podem ser divididos em orgânicos ou extraíveis (tais como: ácidos gordos/alifáticos, aldeídos furânicos, álcoois, glícidos, lactonas, norisoprenóides, carotenóides, esteróides, compostos terpénicos e compostos fenólicos), e em inorgânicos ou cinzas (principalmente o cálcio, o potássio e o magnésio) (Nishimura *et al.*, 1983; Fengel e Wegener, 1989; Chatonnet, 1995b; Masson *et al.*, 1995^a; Nykanen, 1986).

Embora se encontrem em menor quantidade (cerca de 10%), os compostos orgânicos ou extraíveis, desempenham um papel importante nas propriedades e qualidades tecnológicas das madeiras utilizadas na tanoaria. É de destacar a família dos compostos fenólicos pertencentes ao grupo de compostos orgânicos, uma vez que estes são elementos de uma importância crucial, na medida em que intervêm decisivamente nas propriedades mais importantes da madeira (dureza, durabilidade, permeabilidade); e nas características físico-químicas (pH, solubilidade, oxidabilidade) e organoléticas (cor, aroma, sabor) dos produtos enológicos que entrem em contacto com a madeira (Canas & Caldeira, 2009a). Estas influências podem ocorrer de forma direta (devido à existência dos próprios compostos na madeira ou no produto enológico, ou indireta (por reação dos compostos fenólicos entre si ou com outras substâncias).

2.1.1 Ácidos Fenólicos

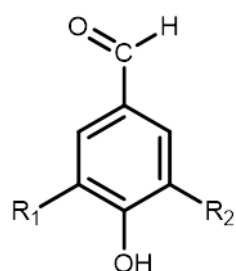
A madeira de carvalho contém seis ácidos fenólicos livres, sendo eles, o ácido gálgico, vanílico, sirínico, p-cumárico, ferúlico e cafeico (Vivas, 2002). Os três primeiros pertencem ao grupo dos ácidos benzóicos, com estruturas em C7 (C6-C1), ao passo que os restantes pertencem aos ácidos cinâmicos, com estruturas em C9 (C6-C3), que podem encontrar-se na forma livre e, sobretudo, esterificados com glucose (Pearl *et al.*, 1957; Ribéreau-Gayon, 1968; Monties, 1987b, Seikel *et al.*, 1971; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Na madeira, é ainda possível encontrar o ácido elágico e o ácido gálgico que resultam da hidrólise parcial dos taninos elágicos e dos taninos gálgicos (Scalbert *et al.*, 1986; Vivas, 2002).

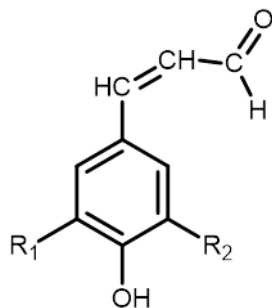
2.1.2 Aldeídos Fenólicos

Os aldeídos fenólicos podem ser classificados segundo dois critérios (Canas, 2003), pelo número de átomos de carbono em benzóicos (vanilina e siringaldeído), e em cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído); e pelo número de grupos metoxilo em guaiacilo (monometoxilados), como a vanilina e coniferaldeído, e em siringilo (bimetoxilados), como o siringaldeído e sinapaldeído (Figura 17).

A presença destes compostos resulta da degradação química da madeira, nomeadamente como resultado dos processos de degradação térmica da madeira. De modo análogo aos ácidos fenólicos, os aldeídos fenólicos podem encontrar-se na sua forma livre ou ligados aos constituintes da parede celular, designadamente à lenhina (Guymon e Crowell, 1968; Ribéreau-Gayon, 1968; Monties, 1987b).



Aldeído benzóico	R ₁	R ₂
Vanilina	OCH ₃	H
Siringaldeído	OCH ₃	OCH ₃



Aldeído cinâmico	R ₁	R ₂
Coniferaldeído	OCH ₃	H
Sinapaldeído	OCH ₃	OCH ₃

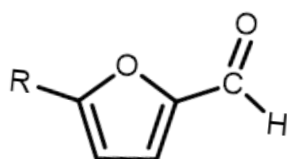
Figura 17 – Estrutura dos aldeídos benzóicos e cinâmicos.

2.1.3 Aldeídos Furânicos

Os aldeídos furânicos são compostos heterocíclicos que contêm um anel furânico, podendo ser divididos em furfural, metilfurfural e hidroximetilfurfural (Puech e Maga, 1993; Masson *et al.*, 1996; Barbe *et al.*, 1998), como se evidencia na Figura 18.

Ainda que os aldeídos furânicos não sejam compostos fenólicos, eles também desempenham papéis semelhantes aos exercidos por eles, quer na influência sobre as

propriedades apresentadas pela madeira, quer nas características dos vinhos envelhecidos na mesma. Estes compostos existem em muito baixas concentrações na madeira de carvalho, sendo no entanto produzidos em quantidades consideráveis durante o processo de tratamento térmico (Boindron *et al.*, 1988; Chatonnet *et al.*, 1989; Barbe *et al.*, 1998).



Aldeído Furânico	R ₁
Furfural	H
Metilfurfural	CH ₃
Hidroximetilfurfural	CH ₂ OH

Figura 18 – Estrutura dos aldeídos furânicos.

3 Influência do tratamento térmico na composição da madeira

Do ponto de vista da tanoaria, o tratamento térmico só era tecnicamente necessário para facilitar a vergadura das aduelas, porém, na perspetiva enológica, a queima afigura-se absolutamente necessária para a modificação da estrutura anatómica, das propriedades físicas (Biermann *et al.*, 1987; Bourgois & Guyonnet, 1988; Fengel & Wegener, 1989; Sarni *et al.*, 1991; Sarni *et al.*, 1990b), e da composição da madeira, como forma de conferir um caráter distinto aos vinhos que neles envelhecem (Chatonnet, 1995b). Assim, pode afirmar-se que a queima é a operação mais importante no processo de fabrico das barricas, cuja qualidade depende estritamente da qualidade da madeira.

Segundo (Chatonnet, 1992), a queima permite também corrigir certas características menos desejáveis da madeira. Dependendo da espécie da madeira, aconselham-se tratamentos térmicos diferentes. Para a madeira de Q. sessiliflora é aconselhável a realização de uma queima entre média e forte, devido a estas conferirem um caráter menos resinoso à madeira, sendo também evitado o excessivo impacto aromático. Quanto à madeira de Q. robur a queima forte é mais adequada, no sentido de reduzir o teor de taninos.

Comparando as mesmas madeiras, mas umas tostadas e outras não, pode-se observar que durante o processo de queima, a concentração dos diversos compostos voláteis poderá aumentar para o dobro (Jordão *et al.*, 2005a).

O nível de queima é usualmente definido pelo binómio (intensidade - temperatura/ duração do tratamento térmico), correspondendo normalmente a três graus de queima: ligeira (QL), média (QM) e forte (QF). No entanto, a definição dos parâmetros característicos da queima – duração/ temperatura, demonstram claramente muita subjetividade (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros definidores do nível de queima (Canas, 2003).

<i>Nível de queima</i>	<i>Temperatura à superfície (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>
QL	120-220 ^a	10 ^a
	180 ^b	5 ^b
	120-180 ^c	5 ^c
QM	250 ^a	20 ^a
	200 ^b	7,5 ^b
	200 ^c	10 ^c
QF	> 300 ^a	20 ^a
	220 ^b	12 ^b
	230 ^c	15 ^c

^aSarni *et al.*(1990); ^bChatonnet & Boindron (1989); ^cChatonnet (1995) citado por Canas (2003).

Por outro lado, o processo de queima é influenciado por numerosos fatores tais como: o nível de humidade da madeira, resultante do processo de secagem (Hale *et al.*, 1999); o movimento convectivo do ar, determinado pela posição da barrica relativamente ao solo e pelo fecho ou não da abertura superior da mesma; a dimensão do fogacho, o seu nível de alimentação e frequência; a periodicidade e tipo de humedecimento (Chatonnet & Boidron, 1989; Matricardi & Waterhouse, 1999).

O processo de queima leva a alterações de alguns dos principais componentes da madeira, nomeadamente dos polímeros parietais (celulose, hemiceluloses, lenhinas), que apresentam sensibilidade térmica, e quando sujeitos ao aquecimento originam uma grande diversidade de produtos de decomposição, com perfis de evolução distintos.

A celulose é uma estrutura muito resistente à temperatura, no entanto a partir dos 200°C esta apresenta uma degradação considerável (Fengel e Wegener, 1989). A sua degradação térmica dá origem à formação de aldeídos furânicos como o metilfurfural, hidroximetilfurfural e 5-metilfurfural (Hodge, 1967).

O papel destes compostos, em termos organoléticos, não é determinante na madeira, no entanto, a maturação do vinho em madeira pode conduzir a transformações organoléticas interessantes (Haluk & Irmouli, 1997).

As hemiceluloses representam os polímeros mais termossensíveis da madeira, mesmo com temperaturas relativamente baixas (120°-130°). Assim, as hemiceluloses quando sujeitas ao tratamento térmico, originam unidades de hexoses e pentoses (glucose, arabinose, manose, xilose) e pequenos polissacárideos.

Esta degradação pode ter uma influência indireta na formação de substâncias aromáticas dos vinhos (Masson *et al.*, 1996; Haluk & Irmouli, 1998).

A degradação das lenhinas, derivada do processo de queima, é um dos aspetos mais marcantes para a composição da madeira e consequentemente, para a qualidade das barricas (Nishimura *et al.*, 1983; Nomdedeu, 1988; Sarni *et al.*, 1991), visto que se formam diversos compostos (fenóis voláteis – eugenol, guaiacol; e aldeídos benzóicos – vanilina, siringaldeído) com grande impacto aromático para o vinho.

As lenhinas da madeira mantêm-se inalteradas até à temperatura de 120°C (Fengel & Wegener, 1989; Sarni *et al.*, 1990a; Vivas *et al.*, 2000). Com temperaturas na gama dos 120-150°C, as lenhinas começam a sofrer transformações, levando à formação de aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído) que são muito importantes no desenvolvimento de aromas no vinho (Masson *et al.*, 1996). A temperaturas mais elevadas pode ocorrer clivagem oxidativa da ligação C-C da cadeia alifática destes aldeídos, originando os aldeídos benzóicos (vanilina e siringaldeído) (Monties, 1987; Sarni *et al.*, 1990b; Chatonnet, 1995b). Com temperaturas entre os 165-185°C ocorre a oxidação dos aldeídos fenólicos formados, originando os respetivos ácidos fenólicos, ácido vanílico e ácido sirínico.

II. Material e Métodos

1 Amostras de madeira

Foram utilizadas aduelas de madeira de carvalho francês da espécie *Quercus petraea*, da marca Pronektar® e fabricadas pela tanoaria Radoux. As aduelas de madeira utilizadas neste estudo apresentavam três tipos de queima: ligeira (*FOL*), média (*FOM*) e forte (*FOM⁺*).

Uma vez que as aduelas apresentavam um comprimento de aproximadamente 95 cm, 4,5 cm de largura e 0,6 cm de espessura, e como não cabiam dentro das cubas de inox que se iriam utilizar, procedeu-se ao corte destas em 8 partes, obtendo-se aduelas com as dimensões de 12 cm de comprimento.

2 Extração e isolamento dos ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos da madeira

Preparam-se três soluções extratoras, correspondentes aos três diferentes tipos de aparas de madeira (Figura 19).

Estas soluções foram preparadas em 500 mL de etanol/ água (12:88, v/v) com cerca de 25 g $\pm$ 0,001 de cada uma das aparas de madeira (0,05 g/mL) e a um pH de 3,5 (ajustado com HCl 2%) com o objetivo de extrair os compostos da madeira de carvalho francês em condições experimentais semelhantes ao que acontece com os vinhos de mesa estudados. As aparas foram mantidas nas soluções hidroalcoólicas durante 24 horas, estando todo o tempo sob agitação ligeira, sendo posteriormente separadas das soluções pelo processo de decantação.



Figura 19 – Soluções extratoras dos três tipos de aparas de madeiras.

De modo a isolar e quantificar a fração dos ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos presentes nestas soluções de aparas, procedeu-se a várias extrações líquido-líquido. Para tal, levou-se a solução extratora ao evaporador rotativo ($T = 30^{\circ}\text{C}$), de forma a evaporar o etanol, e posteriormente ajustou-se o pH dos extratos para 7,0 com NaOH e efetuaram-se três extrações sucessivas com um volume de acetato de etilo correspondente a 1/3 do volume total da solução extratora. As fases orgânicas contendo os ácidos e os aldeídos foram evaporadas à secura num evaporador rotativo ($T = 35^{\circ}\text{C}$) e o resíduo foi recuperado em 5,00 mL de MeOH/ H_2O (1:1, v/v), para posterior análise por HPLC- DAD. A estes resíduos recuperados atribuíram-se as seguintes designações: **C.O. FOL** - Camada orgânica da aduela de carvalho francês com queima ligeira; **C.O. FOM** - Camada orgânica da aduela de carvalho francês com queima média; **C.O. FOM⁺** - Camada orgânica da aduela de carvalho francês com queima forte.

A identificação dos picos cromatográficos, correspondentes aos ácidos e aldeídos, foi efetuada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-Vis com os dos respetivos padrões. Quanto à quantificação destes mesmos compostos, esta foi realizada através das equações das curvas de calibração, obtidas a partir de soluções padrões com uma gama de concentrações de 5,0, 25,0, 50,0, e 100,0 mg/L.

3 Identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos das aduelas de madeira, por HPL-DAD e LC-MS

3.1 Padrões de ácidos fenólicos

Alguns dos padrões de ácidos fenólicos comerciais utilizados, encontram-se representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Padrões de ácido fenólicos comerciais.

<i>Ácidos fenólicos</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Ácido gálico	98	Sigma Aldrich
Ácido p-cumárico	98	Fluka
Ácido cafeico	99	Sigma Aldrich
Ácido elágico	96	Fluka
Ácido ferúlico	98	Fluka
Ácido sinápico	97	Fluka

As soluções padrões dos diferentes ácidos fenólicos foram preparadas a uma concentração de 50 mg/L e de seguida foram analisadas por HPLC-DAD, de modo a obtermos um perfil cromatográfico de cada um deles.

3.2 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

Os diversos padrões de ácidos fenólicos foram analisados diretamente por HPLC (Merck Ref. L-7100) equipado com um detetor UV-Vis (Merck Ref. L-7420 A), por injeção direta de 20 µL de amostra, numa coluna Merck de fase reversa (C18 150 x 4,6 mm d.i.), a uma temperatura de 25°C. Os solventes utilizados foram H₂O/CH₃COOH (99:1, v/v) -

solvente A e $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (70:29:1, v/v/v) - solvente B. A eluição decorreu com um fluxo de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e com o gradiente de acordo com o descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Solvente A (%)</i>	<i>Solvente B (%)</i>
0	80	20
55	20	80
70	10	90
90	0	100

Todos os ácidos fenólicos em estudo foram analisados a 280 nm.

3.3 Análise cromatográfica dos ácidos fenólicos com deteção por espectrometria de massa (LC-MS)

As diferentes camadas orgânicas dos três tipos de aparas de madeira foram também analisadas por LC-MS num cromatógrafo líquido da série *Finnigan Surveyor*, equipado com uma coluna (150 x 4,6 mm d.i.), 5 μm *LicroCART*[®] de C18 de fase reversa termostatzada a 25 °C. A deteção da massa foi feita através de um detetor de massa *Finnigan LCQ DECA XP MAX* (Finnigan Corp., San José, Calif., USA) com uma fonte de ionização API (*Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface ESI (*ElectroSpray Ionization*). Os solventes usados foram A: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (99:1, v/v), e B: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (70:29:1, v/v/v). O gradiente e o fluxo do HPLC foram os mesmos que os referidos na análise por HPLC-DAD. A voltagem do capilar foi de 4 V e a temperatura de 300°C. Os espectros foram obtidos no modo de ião negativo entre m/z 120 e 1500.

3.4 Padrões de aldeídos

A Tabela 4 apresenta os padrões de aldeídos comerciais usados que correspondem a alguns dos aldeídos presentes na madeira de carvalho francês.

Tabela 4 – Padrões de aldeídos comerciais.

<i>Aldeído</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Metilfurfural	99	Sigma Aldrich
Hidroximetilfurfural	99	Sigma Aldrich
Vanilina	99	Sigma Aldrich
Sinapaldeído	98	Sigma Aldrich

Quanto às curvas de calibração dos diversos aldeídos, estas foram obtidas a partir das soluções padrões com diferentes concentrações, numa gama entre os 5,0 e os 100 mg/L (Tabela 5). Estas soluções foram de seguida analisadas em triplicado no HPLC-DAD, e posteriormente quantificadas. Para a quantificação do siringaldeído utilizou-se a curva de calibração da vanilina, e para a quantificação do coniferaldeído usou-se a do sinapaldeído, aldeídos análogos entre si.

Tabela 5 – Equações das curvas de calibração de diversos aldeídos.

<i>Aldeído</i>	<i>Curva de calibração</i>	<i>r²</i>
Metilfurfural	C = 1059071A + 1020935	0.9996
Hidroximetilfurfural	C = 1045429A + 1921758	0.9989
Vanilina/ Siringaldeído	C = 622652A – 259599	0.9998
Sinapaldeído/ Coniferaldeído	C = 94758A + 6544	0.9997

C – concentração (mg/L), A – área do pico

3.5 Análise dos aldeídos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

O método cromatográfico utilizado para a análise dos aldeídos presentes nas frações de madeiras submetidas a diferentes queimas, baseou-se no método desenvolvido por Canas *et al.*, 2003. Contudo, neste trabalho foram introduzidas algumas alterações ao método, de forma a otimizar a identificação dos compostos.

As condições cromatográficas utilizadas foram, a injeção direta de 20 µL de amostra em um HPLC (Merck Ref. L-7100) equipado com um detetor UV-Vis (Merck Ref. L-7420 A), com uma coluna Merck de fase reversa (C18 150 x 4,6 mm d.i.) e a uma temperatura de 40°C. Os solventes utilizados foram H₂O/HCOOH (99:1, v/v) - solvente A e MeOH/H₂O/HCOOH (70:29:1, v/v/v) - solvente B. A eluição decorreu com um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e com o gradiente de acordo com o descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos aldeídos.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Solvente A (%)</i>	<i>Solvente B (%)</i>
0	100	0
3	100	0
25	60	40
43	40	60
55	40	60
60	20	80
65	20	80

Todos os aldeídos (fenólicos e furânicos) em estudo foram quantificados a 280 nm.

3.6 Análise cromatográfica dos aldeídos com deteção por espetrometria de massa (LC-MS)

As frações extraídas dos três tipos de aparas de madeira foram também analisadas por LC-MS, de forma a identificar os diferentes aldeídos presentes nas aduelas de madeira. A análise ocorreu de igual modo que a descrita no parâmetro 3.3, com apenas algumas modificações, nomeadamente a temperatura que decorreu a 40°C, os solventes

usados foram A: H₂O/HCOOH (99:1, v/v), e B: MeOH/H₂O/HCOOH (70:29:1, v/v/v), e os espectros foram obtidos no modo de ião positivo entre *m/z* 120 e 1500.

3.7 Preparação do extrato para análise dos compostos voláteis da madeira por cromatografia gasosa (GC-MS)

Para o estudo dos compostos voláteis presentes em cada tipo de aparas de madeira, foi efetuada uma preparação prévia de um extrato, para cada uma das aduelas.

A preparação do extrato, das camadas orgânicas das aparas de madeira, para injetar no GC-MS foi efetuada através de um método descrito por De Freitas *et al.*, (1999).

Para um matrás, foram adicionados 50 mL da camada orgânica, de cada uma das aparas, 4 mL de hexano/dietil éter (1:1, v/v) (solução extratora) e 5 g de sulfato de sódio de forma a facilitar a extração dos compostos voláteis. Esta solução foi agitada durante 5 minutos numa placa de agitação, de modo a ocorrer a extração líquido-líquido, e de seguida foi transferida para um funil de decantação, onde se procedeu há separação das duas camadas, aquosa e orgânica. A camada orgânica foi separada e a extração foi repetida mais 2 vezes, com o mesmo solvente, para a camada aquosa. Posteriormente, a camada aquosa foi desprezada e as camadas orgânicas foram todas reunidas num único recipiente, onde se adicionou uma pequena quantidade de sulfato de sódio, de forma a secar o resíduo de água que ainda permanece-se. Como a concentração final do extrato era muito diluída, concentrou-se a amostra a 1/3 do seu volume, com árgon. Por fim, procedeu-se à injeção de 2 µL do extrato no GC-MS.

3.8 Análise cromatográfica dos compostos voláteis da madeira com deteção por espectrometria de massa (GC-MS)

As diferentes camadas orgânicas dos três tipos de aparas de madeira foram também analisadas por de GC-MS num cromatógrafo gasoso *Thermo Scientific Trace 1300*, equipado com uma coluna apolar *TG-5MS Thermo Scientific* (60 metros de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e um filme de 0,25 µm). A deteção da massa foi feita através de um detetor MS *ISQ quadrupolo simples* em modo EI (70 eV), e a injeção foi realizada num injetor *Thermo Scientific AI 1310* em modo splitless, a uma temperatura de 280°C, durante um minuto. A temperatura do forno foi programada para 50°C durante 2

minutos, aumentando de seguida para 200°C (6°C/min) e por fim aumentada para 280°C, onde permanece a esta temperatura. O fluxo do gás de hélio foi realizado a 1,2 mL/min.

4 Índice de Folin Ciocalteu

Em meio alcalino, os compostos fenólicos reduzem a mistura dos ácidos fosfotungsténico e fosfomolibdénico em óxidos de tungsténio e de molibdénio de cor azul. A reação ocorre em meio alcalino e a coloração obtida apresenta um máximo a 750 nm, sendo a sua intensidade proporcional à concentração de compostos fenólicos. O procedimento descrito na literatura (Singleton & Rossi, 1965) foi o adotado para o doseamento dos fenóis totais.

Começou-se por diluir as soluções de madeira 20 vezes. De seguida, num micro-tubo (eppendorf) preparou-se uma amostra com 15 µL de amostra diluído, 75 µL de reagente folin e 500 µL de água destilada. Agitou-se a amostra num vortéx e de seguida adicionou-se 300 µL de carbonato de sódio a 20%, 610 µL de água destilada, sendo esta novamente submetida a agitação. Após finalizar a preparação da solução, esta permanece em repouso, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, para uma estabilização completa da reação. Por fim, colocou-se 350 µL desta solução em três poços de uma placa, uma vez que os ensaios foram realizados em triplicado. O branco realizou-se de igual modo, adicionando 350 µL de solução modelo de vinho a três poços da mesma placa e efetuaram-se as leituras da absorvância a 750 nm, num leitor de placas (Power wave XS, Bio-TEK®).

O teor em fenóis totais, expresso em mg equivalentes de ácido gálico.mL⁻¹, foi determinado através de uma curva de calibração obtida a partir do ácido gálico.

5 Propriedades antioxidantes da madeira

5.1 Capacidade Antirradicalar (DPPH)

A avaliação da capacidade antirradicalar dos vinhos foi efetuada utilizando um radical livre estável, o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) que reage com o antioxidante numa solução de metanol segundo o método descrito na literatura (Bondet *et al.*, 1997).

Na sua forma radicalar o DPPH[•] absorve a 515 nm, mas após a redução por um antioxidante ou por uma espécie radical a absorção desaparece. A redução da concentração do DPPH[•] é então monitorizada pelo decréscimo da absorvância durante a reação.

Preparou-se uma solução 60 µM de radical DPPH em metanol e colocou-se 270 µL desta solução numa microplaca de poços. O branco foi efetuado usando 270 µL de DPPH e 30 µL de solução modelo de vinho, ao passo que a amostra foi efetuada com 270 µL de DPPH e 30 µL de uma solução de madeira diluída 20 vezes. As soluções de madeira foram diluídas de modo a ter uma coloração tal que após a reação se obtivesse valores dentro da gama de leituras. As leituras da absorvância foram realizadas num contador de placas, a um comprimento de onda 515 nm, no tempo 0 e 20 minutos.

Cada ensaio foi efetuado em triplicado e os resultados foram expressos em µM equivalentes de trolox, após a realização de uma curva de calibração utilizando soluções deste composto com diferentes concentrações.

5.2 Avaliação do Poder Redutor (FRAP)

A avaliação do poder redutor foi realizada segundo o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) desenvolvido por Benzie & Strain (1996), com algumas modificações. Esta técnica baseia-se na redução do complexo de tripiridiltiazina férrica [Fe(III)-TPTZ]³⁺ a tripiridiltiazina ferrosa [Fe(II)-TPTZ]²⁺, por um antioxidante a pH cerca de 3,6. O produto da reação é detetado através de espetofotometria pois apresenta um máximo de absorção a 593 nm.

Preparou-se o reagente FRAP do seguinte modo: 10 mL de tampão acetato 300 mM, pH 3,6; 1,00 mL de solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40 mM de HCl e 1,00 mL de solução de FeCl₃ 20 mM. De seguida, diluiu-se a solução do reagente a 1/3 do seu volume, com tampão acetato e colocou-se esta solução diluída numa estufa a 37° C, durante um período de 10 minutos. Posteriormente, transferiu-se 270 µL do reagente FRAP para a microplaca de poços e adicionou-se 30 µL de uma solução de madeira diluída 20 vezes com solução sintética. As soluções de madeira foram diluídas com solução sintética de modo a ter uma coloração tal que após a reação se obtivessem valores que cumprissem a lei de Lambert-Beer. O branco foi efetuado com 270 µL de reagente FRAP e 30 µL de solução modelo de vinho. As leituras da absorvância foram realizadas a 593 nm, ao tempo 0 e 4 minutos e a uma temperatura de 37° C. Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados foram expressos em µM equivalentes de

trolox, usando uma curva de calibração obtida a partir de soluções padrão deste composto com diferentes concentrações.

6 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicado. Os valores foram expressos com médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

III. Resultados e Discussão

1 Identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e furânicos das aduelas de madeira, por HPLC-DAD e LC-MS

O estudo dos ácidos fenólicos, presentes nas aduelas submetidas a diferentes tratamentos térmicos, realizou-se por HPLC-DAD, acoplado a espectrometria de massa (LC-MS) em modo negativo; e por comparação com os padrões. A análise dos espectros de UV-VIS em conjunto com a identificação do ião molecular $[M-H]^-$ (m/z), e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, iões MS^2 (m/z) e MS^3 (m/z), permitiu identificar os diversos compostos presentes nas diferentes aduelas (Tabela 7). O cromatograma referente à amostra de aduelas de queima ligeira encontra-se apresentado na Figura 20 tendo-se identificado oito compostos fenólicos.

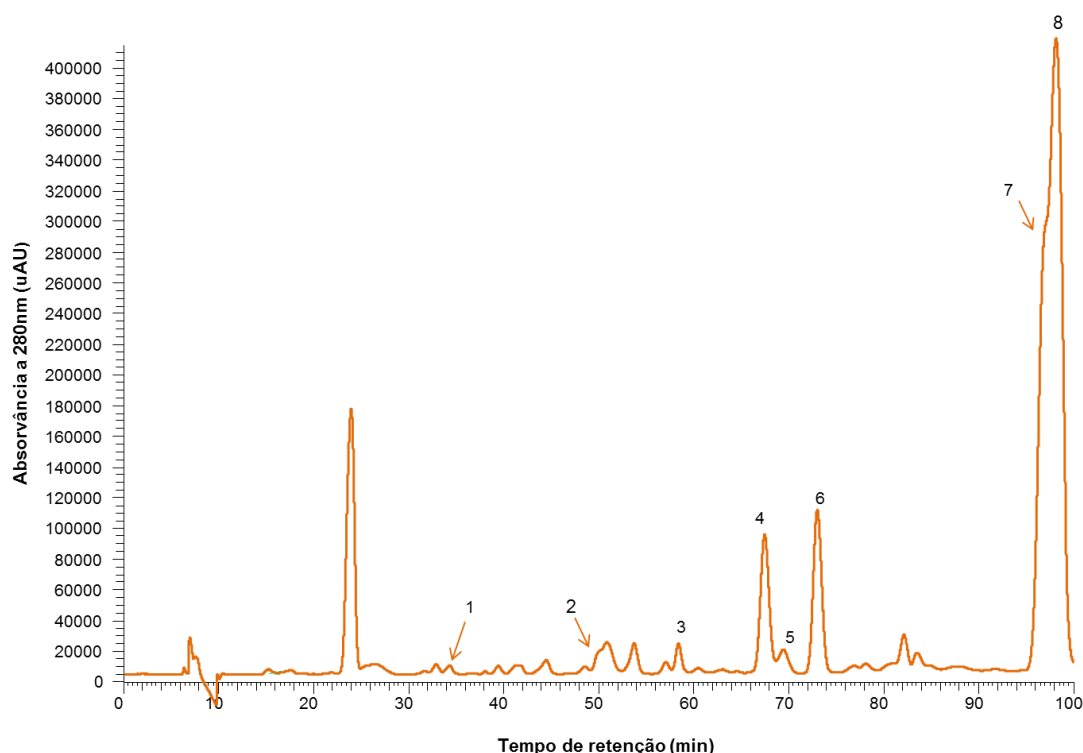


Figura 20 – Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira (C.O. FOL).

Tabela 7 – Ácidos e outros compostos fenólicos identificados por LC-MS, na amostra da aduela de madeira de carvalho francês sujeita à queima ligeira (C.O.FOL).

Nº do pico	Composto	t_R (min)	$[M-H]^-$ m/z	MS^2 (m/z)	MS^3 (m/z)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
1	Siringato de metilo?	34,45	211	181	163; 166; 148	280
2	Siringato de metilo?	50,02	211	196	-	292
3	Siringato de etilo	58,41	225	195; 210	180	298
4	Vanilina	67,48	151	136	-	208
5	Ácido ferúlico	69,43	193	-	-	280-337
6	Siringaldeído	73,03	181	166	151	307
7	Sinapaldeído	96,97	207	192	177	343
8	Coniferaldeído	98,00	177	162	133; 134	340

Para os tempos de retenção de 34,45 e 50,02 minutos, propomos as estruturas de siringato de metilo, uma vez que este éster de massa molecular 212 deriva do ácido sirínigico, ácido resultante do processo de queima/ tratamento térmico das aduelas, e apresenta-se na natureza sob duas formas estruturais, sendo elas o metil-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato e o metil-4-hidroxi-2,6-dimetoxibenzoato, correspondendo cada uma delas a um dos tempos de retenção referenciados.

Efetuuou-se de igual forma a identificação dos diversos ácidos fenólicos para as amostras de aduelas com queimas média e forte, no entanto, como o perfil cromatográfico era semelhante e os compostos identificados eram os mesmos, apenas se apresentou os resultados para uma das queimas das aduelas, sendo ela a queima ligeira (C.O. FOL).

Com este método apenas se conseguiu identificar um ácido fenólico – o ácido ferúlico, os restantes compostos identificados foram aldeídos. Contudo, uma vez que os aldeídos respondem melhor em modo positivo e uma vez que desenvolvemos um método de identificação dos mesmos, então procedeu-se a uma nova análise dos diferentes extratos de madeira (C.O. FOL, C.O. FOM e C.O. FOM⁺) no LC-MS, de modo a identificar todos os aldeídos presentes nas aduelas.

A identificação dos picos cromatográficos foi realizada de acordo com os seus tempos de retenção, espetros de UV-Vis e por LC-MS quando comparados com os dos padrões. Na Figura 21, encontra-se representado apenas o cromatograma relativo ao

extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira, uma vez que, os restantes extratos das aduelas sujeitos à queima média e à queima forte apresentam um perfil idêntico. Na Tabela 8 encontram-se descritos os dados de fragmentação para os aldeídos fenólicos presentes na aduela de madeira de carvalho francês sujeita à queima ligeira (C.O.FOL).

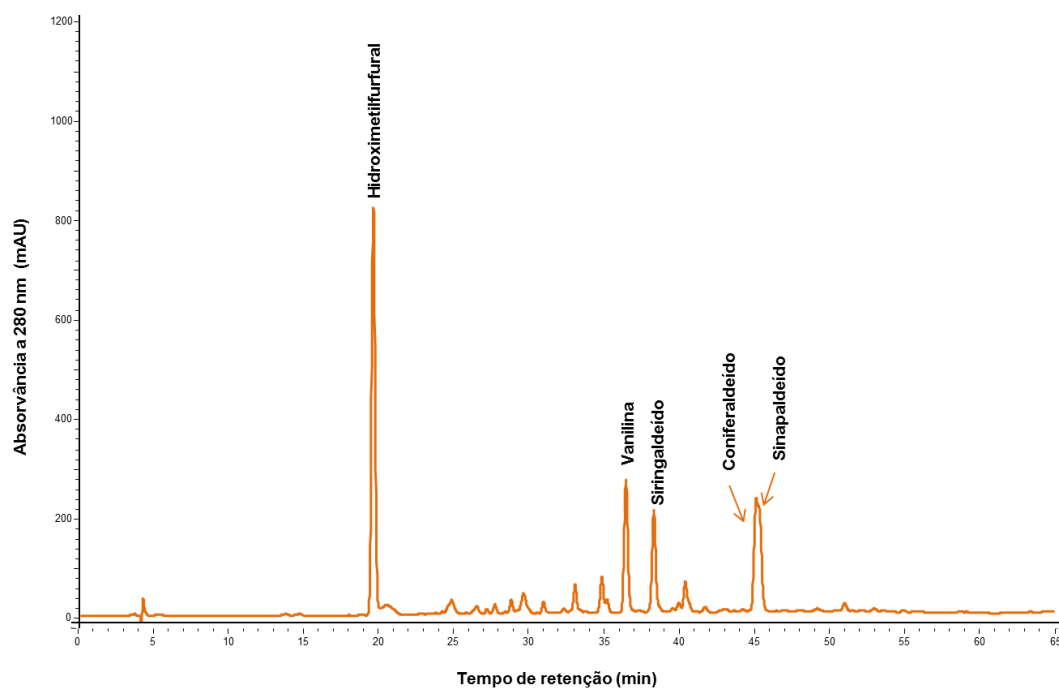


Figura 21 – Cromatograma de HPLC-DAD a 280 nm correspondente ao extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira (C.O. FOL).

Tabela 8 - Aldeídos fenólicos identificados por LC-MS, no extrato da aduela de madeira de carvalho francês sujeita à queima ligeira (C.O.FOL).

Composto	t _R (min)	[M-H] ⁺ m/z	MS ² (m/z)	MS ³ (m/z)	λ _{máx} (nm)
Hidroximetilfurfural	20,32	127	109	81	277
Vanilina	37,05	151	136	-	280-310
Siringaldeído	39,08	183	155; 123	123; 140; 95	307
Coniferaldeído	45,68	179	147;161	133; 104; 119; 91	337
Sinapaldeído	46,03	209	177; 191	149; 121;177;131;145;103; 134; 107; 117; 163; 93; 79; 160; 159; 54;150	322-337

Todos estes compostos já foram previamente descritos em madeira de carvalho francês (Canas *et al.*, 2003).

No que se refere à quantificação destes aldeídos presentes nas três amostras de aparas de madeira, esta foi realizada por HPLC-DAD e os resultados são apresentados nas Figura 22 e Figura 23.

Quanto à média observada para cada uma das aduelas de madeira, esta foi obtida a partir da análise de triplicados de cada um dos extratos.

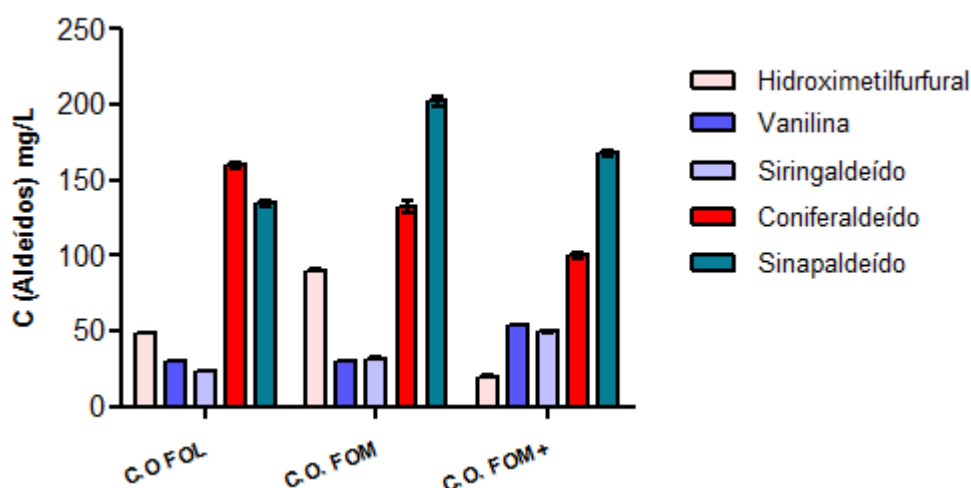


Figura 22 – Histograma referente à composição dos diferentes aldeídos presentes nas aparas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

De acordo com a análise estatística realizada através da análise de variância a um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações entre grupos, verifica-se que a intensidade da queima aplicada a cada uma das aduelas de madeira, influencia o seu teor em aldeídos, uma vez que existem diferenças significativas em termos individuais para cada um dos cinco aldeídos presentes nos três extratos de aduelas.

O teor de vanilina e de siringaldeído presentes no extrato das aduelas de queima forte é relativamente superior ao presente nas aduelas de queima ligeira e média, devido ao processo de clivagem oxidativa da ligação C-C da cadeia alifática dos aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído) (Monties, 1987; Sarni *et al* 1990b; Chatonnet, 1995). Quanto à concentração de coniferaldeído, observa-se que esta diminuiu com o aumento do tratamento térmico, pois a sua estrutura começa a ser afetada quando a temperatura é muito elevada (Sarni *et al*, 1990a; Chatonnet, 1995). O hidroximetilfurfural e o sinapaldeído, apesar de se apresentarem em diferentes quantidades para cada aduela, seguem um comportamento análogo, sofrendo um aumento na passagem da queima ligeira para a queima média, e uma diminuição na passagem da queima média para a queima forte.

Pode também observar-se que os aldeídos que prevalecem em maiores concentrações nos três diferentes extratos de aparas de madeira são, os aldeídos cinâmicos – Coniferaldeído e Sinapaldeído.

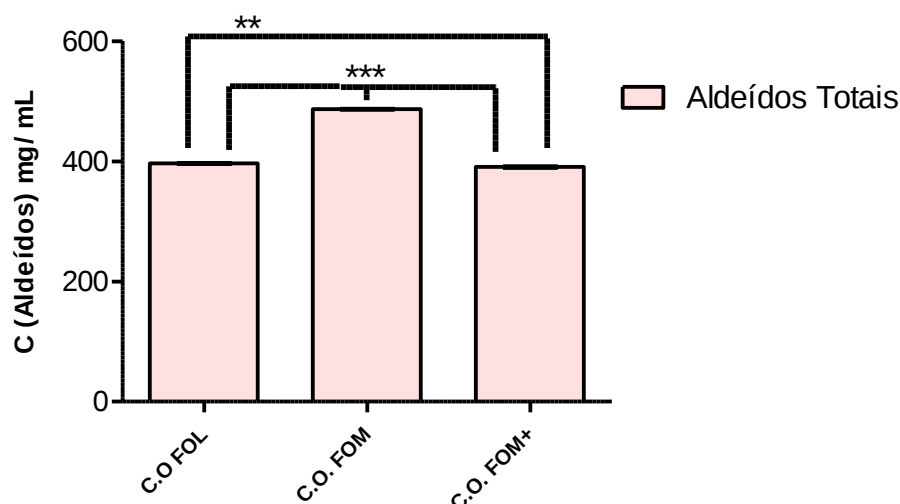


Figura 23 – Histograma referente aos valores médios de aldeídos presentes nas aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. **P <0,01; ***P <0.001

De um modo geral, verificamos que o teor total de aldeídos sofre um aumento significativo da amostra de aduelas sujeita a uma queima ligeira, para a amostra de aduelas sujeita a uma queima média, baixando de seguida significativamente quando passa da queima média para a queima forte (Figura 23). Este resultado vai de acordo com o descrito por Chatonnet *et al.* (1989), que defende que as mudanças provocadas pelo moderado aquecimento da madeira resultam num aumento elevado da concentração de compostos fenólicos até um certo grau de queima (queima média). A partir de temperaturas muito elevadas os aldeídos sofrem reações de degradação, diminuindo o seu teor, dando origem aos correspondentes ácidos fenólicos.

1.1 Identificação dos principais compostos voláteis da madeira por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

Os aldeídos fenólicos e furânicos são os compostos mais numerosos e abundantes, identificados na madeira tostada (Nishimura *et al.*, 1983). Contudo, existem outros compostos fenólicos, nomeadamente compostos voláteis, que são formados durante o processo de queima e são responsáveis pelas notas “picante”, “doce”, “caramelo tostado”, “mel”, “fumo” da madeira tostada, que contribuem ativamente para o aroma do vinho (Chatonnet *et al.*, 1990).

Atualmente, o estudo do perfil volátil de vinhos envelhecidos em madeira tem sido proposto como uma útil ferramenta de identificação da espécie de madeira utilizada no seu envelhecimento. Fernández de Simón, B. *et al.*, (2014), propõe dois marcadores químicos de autenticidade da madeira, nomeadamente o 2,4-dihidroxibenzaldeído utilizado como marcador químico de vinhos envelhecidos em madeira de acácia, e o etil-2-benzoato usado como marcador de vinhos envelhecidos em madeira de cerejeira. Também os isómeros *cis* e *trans* da β -metil- γ -octalactona, conhecidos correntemente por whiskey lactonas, são considerados como marcadores do uso de madeira da espécie “*Quercus*” – carvalho, durante o processo de envelhecimento do vinho.

De forma a estudar o perfil volátil dos três tipos de aduelas de madeira de carvalho francês sujeitas às queimas ligeira, média e forte, foi realizada uma análise por GC-MS, como se encontra representado na Figura 24.

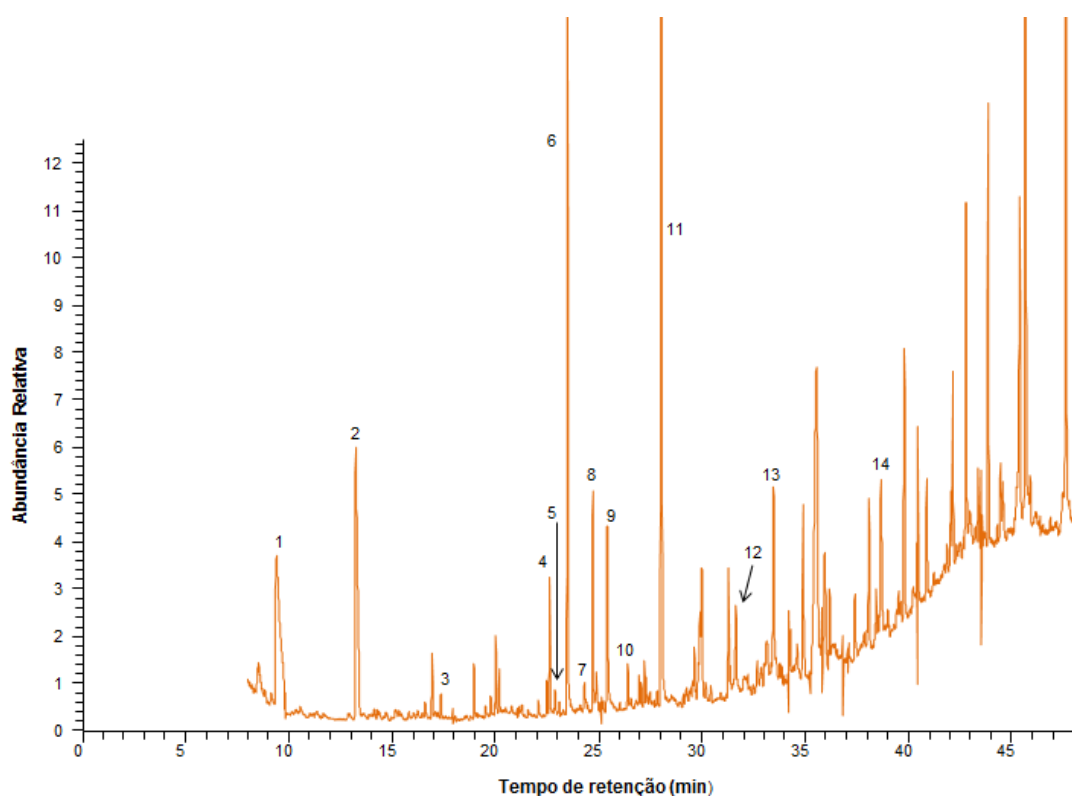


Figura 24 - Cromatograma dos compostos voláteis identificados a partir da aduela de madeira tostada ligeiramente (C.O.FOL), obtido por GC-MS.

A identificação dos picos foi realizada, por comparação dos espectros obtidos pelos compostos padrões comerciais, e por comparação com os compostos descritos por Rodríguez Bencomo, J, J. *et al* (2008), podendo ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Identificação dos compostos voláteis presentes na C.O.FOL, por GC-MS.

<i>Nº do pico</i>	<i>Composto</i>	<i>t_R (min)</i>	<i>MS (m/z)</i>	<i>lões de referência</i>
1	Furfural	9,41	96	95; 67
2	Metilfurfural	13,24	110	109; 53; 81
	Desconhecido	15,81	122	121; 65; 93; 76; 91; 104
3	Guaiacol	17,08	109	81; 124
4	Trans-whiskey-lactonas	22,61	99	71; 69; 87
5	Hidroximetilfurfural	22,88	126	43; 79; 109
6	Cis-whiskey-lactonas	23,47	99	69; 87
7	Siringol	24,10	154	139; 93; 111; 149; 97; 125
8	Eugenol ou Trans-isoeugenol	24,31	164	149; 103; 131; 121; 137
9	Vanilina	25,40	152	151; 81; 123; 109
	Desconhecido	26,39	168	153; 125; 107; 79; 65
10	Cis-isoeugenol	26,55	164	77; 91; 121; 149; 103; 133
11	Éter (solvente)	28,02	205	
12	Siringaldeído	31,62	182	181; 93; 160; 96; 111; 139
13	4-hidroxi-2-metoxi-cinamaldeído	33,44	178	77; 107; 135; 147; 161; 109; 163
14	Sinapaldeído	38,64	208	206; 165; 177

Em geral, o furfural encontrado na madeira queimada deriva das pentoses, dos quais são os principais constituintes da hemicelulose. Durante o processo de tostagem, alguns dos compostos da madeira de carvalho como as hemiceluloses, dos quais são os polímeros mais termosensíveis na madeira, são preferencialmente degradados, conduzindo assim à formação deste composto. Quanto aos álcoois fenólicos, eugenol e guaiacol, estes surgem a partir da termodegradação da lenhina. As *cis*-whiskey lactonas e as *trans*-whiskey-lactonas, são produzidas a partir da desidratação do 2-metil-3-(3,4-dihidroxi-5-metoxibenzo)-ácido octanóico, e elas estão entre as substâncias voláteis mais importantes, vindas a partir da madeira (Chira, K. *et al.*, 2015).

De entre os vários compostos voláteis encontrados, a vanilina é o mais importante do ponto de vista organolético, no que diz respeito ao envelhecimento do vinho, uma vez que é o principal marcador do aroma da baunilha, e uma vez que está associada ao aroma de café, chocolate preto e fumado (Spillman, Pöllnitz, Liacopoulos, Skouroumounis, Sefton, 1997).

Nesta análise, optou-se por representar apenas os resultados relativos à amostra da aduela de madeira de carvalho francês sujeita a uma queima ligeira, uma vez que, as restantes amostras das aduelas sujeitas à queima média e à queima forte apresentavam um perfil de compostos idêntico.

2 Índice de Folin Ciocalteu

O índice de Folin Ciocalteu baseia-se na capacidade que os compostos fenólicos possuem em reduzir a mistura dos ácidos fosfotungsténico e fosfomolibdénico em óxidos de tungsténio e de molibdénio de cor azul, em meio alcalino. Os valores médios obtidos para cada amostra encontram-se representados na Figura 25.

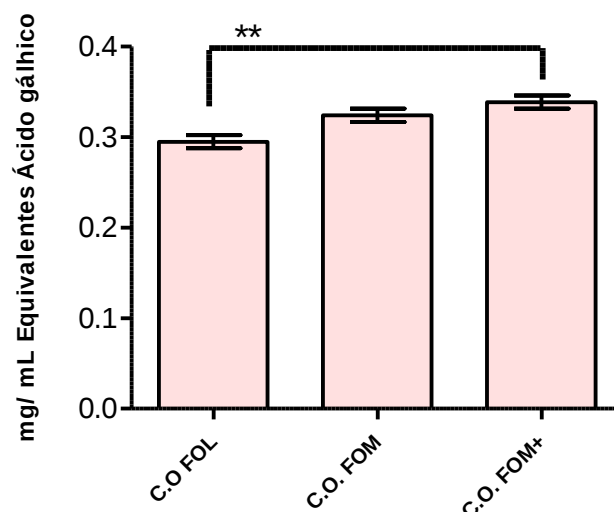


Figura 25 – Histograma referente aos valores médios do índice de folin ciocalteu das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. **P < 0,01

De acordo com a análise estatística realizada através da análise de variância a um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparação entre os grupos indica que o índice de Folin Ciocalteu aumenta com o grau de queima, existindo diferenças significativas entre a queima ligeira e a queima forte. Este facto pode dever-se à evidente mudança da composição polifenólica da madeira, causada pelo processo de tostagem, no qual ocorre a degradação térmica das lenhinas que estão presentes na madeira, originando um aumento dos diversos compostos fenólicos, nomeadamente fenóis voláteis e aldeídos e ácidos fenólicos (Hale *et al.*, 1999).

3 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor

Os compostos polifenólicos encontrados na madeira de carvalho têm funções importantes nos vinhos envelhecidos. Os polifenóis do carvalho não só têm um papel essencial na maturação do vinho, como também apresentam fatores associados a potenciais efeitos antioxidantes (Alañón, 2011). Estes compostos são normalmente classificados em três principais classes: fenóis voláteis, ácidos fenólicos e elagitaninos.

A avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres (capacidade antiradicalar) foi efetuada utilizando o radical estável DPPH. Para avaliar o poder redutor dos vinhos, utilizou-se o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

3.1 DPPH

Os resultados referentes à capacidade antiradicalar (DPPH) das diversas aduelas de madeira de carvalho francês sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos, encontram-se representados na Figura 26.

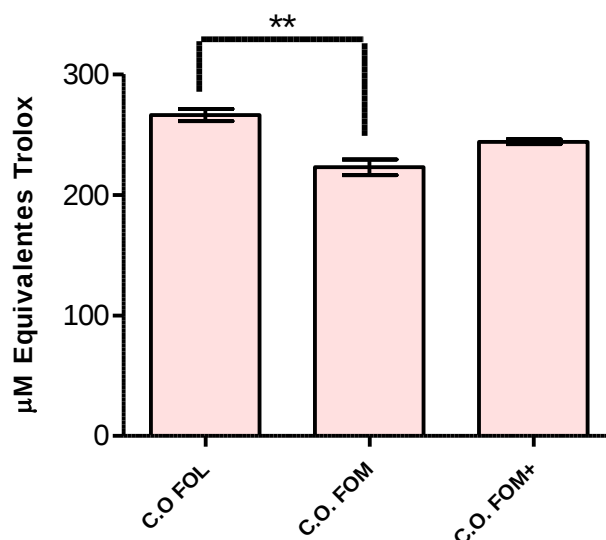


Figura 26 – Histograma referente aos valores médios da capacidade antiradicalar das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. **P < 0,01

De acordo com os dados obtidos na Figura 26, verificamos que as aduelas de madeira de queima ligeira e forte são as que apresentam uma maior capacidade antiradical comparativamente com as aduelas de queima média, estando este facto relacionado com a presença de uma maior quantidade de ácidos fenólicos.

Estes resultados obtidos encontram-se relacionados com os encontrados por Alañón, M.E. (2011), que observou que os ácidos fenólicos apresentam uma correlação significativa com a capacidade antiradicalar. O que demonstra que estes compostos podem dar um contributo importante para o poder antioxidante global da madeira de carvalho. Além disso, de entre os vários ácidos fenólicos presentes na madeira, o ácido gálgico é aquele que se destaca com maior contribuição para a elevada actividade antioxidante, uma vez que estruturalmente este composto apresenta três grupos hidroxilo livres. Estes factos foram também já demonstrados por outros autores (Canas *et al*, 2008; Bakkalbase *et al*, 2009).

3.2 FRAP

Na figura seguinte estão representados os resultados médios do poder redutor referentes às amostras de aduelas de madeira de carvalho francês, sujeitas a diferentes queimas.

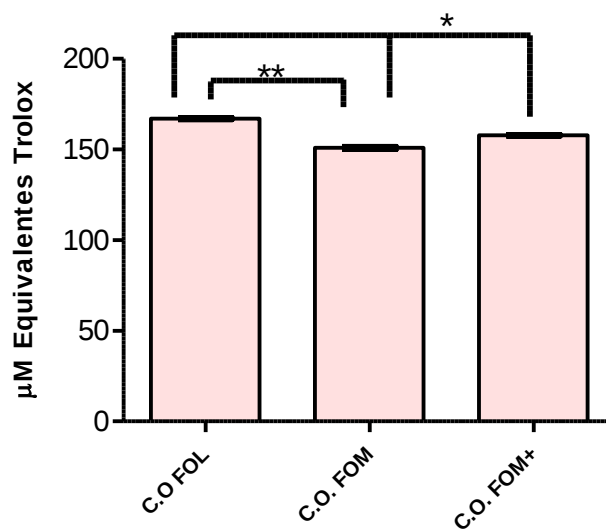


Figura 27 – Histograma referente aos valores médios do poder redutor das aparas de madeira sujeita a diferentes queimas. *P <0,05; **P <0,01

Observando os resultados obtidos, verifica-se que estes seguem o mesmo perfil que o da capacidade antiradical, sendo que aqui, a C.O.FOM difere estatisticamente da C.O.FOL e da C.O.FOM⁺ (Figura 27).

Tal como o esperado, a elevada complexidade estrutural presente nas aparas de madeira sujeitas à queima média, leva a uma diminuição do poder redutor, uma vez que com o aumento da complexidade estrutural dos compostos fenólicos, cada vez é mais difícil o acesso a este grupo, reflectindo uma perda gradual da capacidade de complexação de iões metálicos (Gaulejac *et al.*, 1999).

Vários estudos indicam que os principais compostos responsáveis pela capacidade antiradical da madeira de carvalho, são os elagitaninos. Estes apresentam-se em maiores quantidades na madeira sujeita à tosta ligeira, uma vez que eles são consideravelmente degradados ao longo do processo de queima. A sua elevada actividade deve-se à sua estrutura, uma vez que esta é caracterizada pela presença de vários grupos hidroxilo na posição *orto*-catecol; e da qual exhibe uma elevada capacidade

de quelatar iões metálicos nestas posições, e de doar um átomo de hidrogénio suportando o eletrão não emparelhado (Alañón, M.E., 2011; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Capitulo II

Caraterização polifenólica de um vinho tinto de mesa em contato com três tipos de aduelas com diferentes graus de queima. Comparação com o estágio em barricas de madeira com graus de tostagem semelhantes.

I. Introdução

No mundo dos vinhos, é conhecido o facto de cada país produtor, desenvolver ao longo do tempo, o cultivo de certas castas de uvas com maior sucesso do que outras. Esta ocorrência deve-se essencialmente ao tipo de solo e clima de cada uma das regiões e às condições de adaptação das diversas castas.

Nesse sentido, na Austrália o Syrah é a sua principal variedade de uva; em Espanha o nobre Tempranillo; na Argentina a Malbec, e em Portugal predomina a mais nobre das castas, a Touriga Nacional.

A Touriga Nacional é a rainha das uvas tintas portuguesas. Esta teve origem nas terras da região do Dão, um importante reduto vinícola do país lusitano, mas o seu cultivo há muito tempo ganhou importância em todo o território nacional, do Alentejo ao Douro.

A casta Touriga Nacional apresenta um potencial enológico muito grande, quer em compostos aromáticos, quer em compostos fenólicos. Vinhos elaborados com esta casta apresentam características específicas, tais como: bom teor alcoólico, ótima concentração de cor, elevada complexidade, taninos finos, sabores intensos, volume, equilíbrio e aromas florais distintos.

A Touriga Nacional é considerada a casta tinta “embaixadora de Portugal”, e não é por acaso que tem tido tanta aceitação a nível internacional. A Austrália, os Estados Unidos, o Chile e a África do Sul, são alguns dos países do novo mundo que recentemente incluíram a Touriga Nacional nos vinhos de elevada qualidade que desenvolvem. O potencial de guarda dos vinhos produzidos a partir desta casta é excelente, eles evoluem em garrafa com bastante facilidade. Por outro lado, o estágio em madeira de carvalho dá-lhes mais qualidades aromáticas e melhora a sua estrutura, além de arredondar os seus taninos com maior velocidade, o que torna o vinho pronto para consumo em pouco tempo.

Por estas razões, o trabalho realizado vai de encontro a responder à necessidade de encontrar um tratamento térmico e um tempo de estágio adequados, que se ajustem às características específicas deste nobre vinho de casta Touriga Nacional.

1 Transformações dos compostos fenólicos nos vinhos

Durante o processo de maturação e envelhecimento dos vinhos, os compostos fenólicos, nomeadamente os flavan-3-óis e as antocianinas sofrem várias transformações estruturais, resultantes das reações de oxidação-redução, condensação, polimerização e complexação com outros compostos, tais como as proteínas, os polissacáridos e os metais (Haslam, 1980; Ricardo da Silva *et al.*, 1991a). Deste modo, os taninos e as antocianinas são progressivamente transformados em pigmentos oligoméricos e poliméricos mais estáveis e com características físico-químicas distintas dos seus precursores, contribuindo desta forma para a alteração das propriedades organolépticas como a cor e o sabor do vinho (Monagas *et al.*, 2005).

Nos vinhos tintos, para além da reação de condensação direta antocianina-flavanol (Somers, 1971) ou mediada pelo acetaldeído (Timberlake & Bridle, 1976b), também ocorrem reações de condensação das antocianinas com compostos mais pequenos tais como o ácido pirúvico, levando à formação de novos pigmentos, como as piranoantocianinas de cor laranja, que são pigmentos mais estáveis e mantêm uma intensidade corante estável nos vinhos durante longos períodos de tempo (Bakker & Timberlaker, 1997; Fulcrand *et al.*, 1996; Mateus *et al.*, 2002; Monagas *et al.*, 2003b; Schwarz *et al.*, 2003).

As reações entre as antocianinas e os flavanóis, para além de serem mediadas pelo acetaldeído (aldeído abundante no vinho), podem também ser mediadas por outros aldeídos existentes nos vinhos tais como o formaldeído, o propionadeído, o isobutiraldeído, o furfural, o hidroximetilfurfural, o benzaldeído e o isovaleraldeído, formando adutos corados (Es-Safi *et al.*, 2002a; Pissarra *et al.*, 2003; Pissarra *et al.*, 2004a). Estes aldeídos embora presentes nos vinhos tranquilos são muito mais abundantes em vinhos fortificados devido à rica composição da aguardente nestes compostos.

As transformações estruturais que resultam das reações entre as antocianinas e os flavanóis, conduzem, numa primeira fase a um aumento da intensidade corante dos vinhos e a uma alteração da tonalidade, de vermelho vivo para vermelho violeta, correspondente da formação dos adutos antocianina-etil-flavanol (Somers, 1971; Francia-Aricha *et al.*, 1997). Durante o envelhecimento dos vinhos outras reações de oxidação e polimerização são responsáveis pela cor vermelho-alaranjada (Somers, 1971; Timberlake & Bridle, 1976b; Pissarra *et al.*, 2003). Para além desta alteração da cor, os vinhos tornam-se menos adstringentes durante o envelhecimento uma vez que, para além de haver uma menor quantidade de proantocianidinas, as que permanecem no

meio, por estarem polimerizadas, têm menor capacidade de reagir com as glicoproteínas da saliva, diminuindo desta forma a sensação de adstringência.

São vários os parâmetros que afetam a ocorrência destas reações químicas durante o processo de envelhecimento dos vinhos, como a concentração em antocianinas, copigmentos, acetaldeído e outros metabolitos das leveduras, o pH, a temperatura e a presença de luz, de oxigénio e de dióxido de enxofre (Dallas *et al.*, 1995; Somers & Evans, 1986; Romero & Bakker, 1999; Romero & Bakker, 2000).

Além destes fatores, também o tipo de armazenamento onde ocorre a evolução e maturação dos vinhos, influencia as transformações químicas deste tipo de compostos. O envelhecimento dos vinhos em barricas ou na presença de aduelas pressupõe que o vinho poderá extrair da madeira uma série de compostos tais como taninos elágicos, ácidos fenólicos e aldeídos fenólicos, levando a alterações da composição inicial do vinho. Entre os vários compostos extraídos, os aldeídos poderão ser os compostos de destaque, uma vez que participam ativamente numa série de reações que envolvem os constituintes do vinho (especialmente antocianinas e flavanóis). Destas reações poderão resultar a formação de novos compostos que apresentem propriedades distintas, ao nível das características físico-químicas e organoléticas dos vinhos.

Assim, este último facto realça a importância da madeira no setor vitivinícola, uma vez que a sua composição química pode influenciar as propriedades organoléticas do vinho, nomeadamente a cor e o sabor.

II. Material e Métodos

1 Amostras de vinho

Neste estudo utilizou-se um vinho de mesa tinto monovarietal da colheita de 2014, produzido a partir de uvas da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro. A vinificação teve lugar na adega de Alijó da empresa Gran Cruz Porto – Sociedade Comercial de Vinhos Lda, com uvas exclusivamente da quinta do Todão. As uvas seguiram um procedimento de vinificação normal, de vinho de mesa tinto. Após a fermentação malolática o vinho foi transferido para 10 cubas de inox, cada uma com uma capacidade de 30 L. Foram utilizadas 3 cubas para cada uma das aduelas de madeira de carvalho francês estudadas, de modo a que tivéssemos 3 repetições por queima; e uma cuba para o vinho controlo – que não levou qualquer tipo de adição de aduelas (

Figura 28).

Relativamente à concentração das aduelas a usar, esta foi de acordo com o recomendado pelo fabricante 2 - 4 g/ L. Todas as aparas usadas eram de tamanho similar $12 \times 4,5 \times 0,6$ cm, e com pesos aproximados de 95,0 g, sendo que cada uma delas apresentava um nível de queima diferente.

O mesmo vinho foi ainda colocado em três barricas de 500 L, de marcas diferentes e com diferentes graus de queimas. O Casco 62 da marca Seguin Moreau apresenta uma queima ligeira, o Casco 68 da marca Radoux apresenta uma queima forte; e o Casco 69 da marca Tonnellerie Baron apresenta uma queima ligeira, tal como o primeiro (

Figura 28).



Figura 28 – Cubas de inox com vinho touriga nacional em contato com aduelas de madeira, sujeitas a diferentes queimas; e barricas de madeira, de carvalho francês com diferentes tratamentos térmicos, com o mesmo vinho touriga nacional.

As cubas de inox foram cheias dia 25 de Novembro de 2014, estagiando o vinho durante 6 meses.

Inicialmente recolheu-se uma amostra testemunha do depósito, considerada como Controlo. Após o início do período de estágio, foram recolhidas amostras de 2 em 2 meses para análise química, estando representados na Tabela 10 os meses correspondentes.

Tabela 10 – Data das análises químicas.

<i>Tempo de estágio (meses)</i>	<i>Data das análises químicas</i>
0	Novembro
2	Janeiro
4	Março
6	Maio

2 Análises físico-químicas

2.1 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)

A análise realizada para a identificação dos ácidos fenólicos presentes no vinho de casta touriga nacional, ao tempo zero, ocorreu de igual modo ao descrito no ponto 3.3 do capítulo 1, diferindo apenas no comprimento de onda a que os cromatogramas são analisados, 280 e 520 nm.

2.2 Índice de Fenóis Totais

O método do Índice de fenóis totais baseia-se na capacidade que os anéis benzénicos têm em absorver radiação na região do ultra-violeta, sendo o seu comprimento de absorção máxima a 280nm.

Para a determinação do índice de fenóis totais utilizou-se um espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array e células de quartzo de percurso ótico de 10 mm. As diversas soluções foram medidas em relação ao branco (solução modelo de vinho). Os vinhos foram diluídos 100 vezes com uma solução sintética água/etanol 12% (v/v) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH 3,50.

O Índice de Fenóis Totais (IFT) é calculado através da seguinte expressão:

$$\text{IFT} = \text{Abs (280 nm)} \times \text{f.d.} \qquad \text{f.d.} = 100$$

2.3 Taninos Proantociânicos Totais

A quantidade de taninos proantociânicos totais foi analisada diretamente nos vinhos, com base no método descrito na literatura (Ribéreau & Stonestreeer, 1996; Darné, 1991). Este método baseia-se na reação de Bate-Smith, que consiste na decomposição dos taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas - compostos sem cor) quando

sujeitos a um meio ácido ou sob a ação do calor, libertando compostos corados – as antocianidinas.

Começou-se por diluir os vinhos 50 vezes, com solução modelo de vinho. Posteriormente, adicionou-se ao tubo de hidrólise 4,00 mL dessa solução diluída, 2,00 mL de água desionizada e, por último foi adicionado 6,00 mL de HCL de 37% para assegurar que a decomposição dos taninos apenas se iniciava aquando do aquecimento das soluções. De seguida, os tubos foram rolhados e aquecidos em banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Para cada amostra foi utilizada uma solução de referência preparada exatamente da mesma forma, mas sem ser sujeita ao aquecimento. Após o aquecimento, os tubos foram arrefecidos em água fria e mantidos ao abrigo da luz durante 10 minutos. Após esse período de tempo, os tubos foram retirados da água, envoltos em papel de alumínio e de seguida adicionou-se 1,00 mL de etanol (estabilizar a cor das antocianinas) agitando-se posteriormente num vórtex.

Por fim, mediu-se a absorvância de todas as soluções (aquecidas e de referência) a um comprimento de onda de 520 nm, em células de vidro de percurso ótico de 10 mm, num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array.

O valor de absorvância de cada amostra é obtido através da seguinte expressão:

$$\Delta_{\text{abs}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{referência}}$$

Cada ensaio foi realizado em triplicado e o teor em taninos proantociânicos totais (g.L^{-1}) nos vinhos, foi calculado usando uma reta de calibração obtida a partir de soluções padrão:

$$[\text{Vinho}] (\text{g/L}) = \Delta_{\text{abs}} - 0,0178 / 0,0456$$

2.4 Poder Tanante

O poder tanante dos vinhos caracteriza-se pela capacidade que alguns compostos fenólicos possuem, nomeadamente os taninos, de interagirem com as proteínas formando agregados insolúveis. O poder tanante dos vinhos foi determinado por nefelometria de acordo com o procedimento descrito na literatura (De Freitas & Mateus, 2001).

Começou-se por diluir o vinho 50 vezes com uma solução modelo de vinho, água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico, a um pH 3,50, previamente filtrado (0,45 µm). Seguidamente pipetaram-se 4,00 mL desta solução para 4 tubos de ensaio, agitaram-se num vórtex e efetuou-se a leitura da turbidez (Turbidez_{branco}).

Posteriormente, adicionou-se 150 µL de solução aquosa de proteína albumina sérica bovina (BSA) 0,8 g/L a cada tubo de ensaio, que depois foi agitado num vórtex e guardado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Após esse período, efetuou-se a leitura do valor de turbidez máximo (Turbidez_{amostra}).

A leitura da turbidez foi realizada num turbidímetro HACH 2100 N, equipado com um adaptador de células de 100x12 mm.

O poder tanante dos vinhos é expresso em unidades de turbidez (NTU.mL⁻¹) e foi determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Turbidez (NTU/mL de Vinho)} = \frac{(\text{Turbidez amostra} - \text{Turbidez branco})}{0,08}$$

2.5 Índice de Diálise

O índice de diálise permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos polifenólicos presentes no vinho, através da determinação da percentagem de compostos polimerizados que ficam retidos no interior de uma membrana de diálise (celulose; 6 mm d.i.; cut off 12-16 KDa de peso molecular; porosidade média de 25 Å de raio). O procedimento experimental foi realizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (Glories, 1978; Mateus *et al.*, 2001c).

Uma fração de 5,00 mL de vinho foi introduzida numa membrana de diálise, com 25 cm de comprimento, e colocada num frasco de vidro com 50,0 mL de solução modelo de vinho previamente filtrado (0,45 µm). Simultaneamente, preparou-se uma solução de referência num balão de 50 mL, onde foram diluídos 5 mL da amostra com a solução sintética de vinho. Os frascos e os balões foram fechados e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 24 horas. Após este período de tempo, foi medida a absorvância a 280 nm, num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, utilizando-se células de quartzo de percurso ótico de 1 mm.

O índice de diálise foi calculado através da expressão:

$$I.D. = \left[\frac{(D_0 - D)}{D_0} \right] \times 10$$

Tanto as leituras da absorvância do dialisado como da solução de referência, foram realizadas em triplicado.

2.6 Análise da Cor

2.6.1 Intensidade Corante

Os vinhos novos apresentam um máximo de absorvância ao comprimento de onda de 520 nm (característico da cor vermelha). Ao longo do processo de envelhecimento dos vinhos, ocorre uma diminuição da cor vermelha, associada à diminuição de absorção a 520 nm, e surgem tonalidades amarelas/castanhas que resultam do aumento da absorvância aos 420 nm.

Também o contributo das formas quinonas das antocianinas livres e combinadas não pode ser desprezada, sendo por isso necessário considerar a região dos azuis (620 nm). Por esse motivo, os comprimentos de onda que são considerados para o cálculo da Intensidade corante são: 420, 520 e 620 nm.

Todas as amostras de vinho antes de serem analisadas foram filtradas com um filtro de porosidade 0,45 µm.

As absorvâncias das amostras de vinho foram lidas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, e em células de quartzo de percurso ótico de 1 mm.

Assim, a intensidade corante foi calculada através da soma dessas mesmas absorvâncias e multiplicada por 10:

$$IC = [Abs (420 \text{ nm}) + Abs (520 \text{ nm}) + Abs (620 \text{ nm})] \times 10$$

2.6.2 CIELab

O sistema CIELab foi o sistema utilizado para a quantificação e medição da cor. Está organizado segundo um sistema de coordenadas cartesianas retangulares que traduzem com maior precisão a sensibilidade humana em relação à cor.

Os parâmetros base que caracterizam uma cor são: a luminosidade (L), a saturação ou cromaticidade (C) e a tonalidade (h).

A luminosidade (L) corresponde à transmitância e varia inversamente com a densidade corante do vinho. Os valores de luminosidade oscilam entre 0 (para uma amostra completamente opaca) e 100 (para uma amostra completamente transparente).

A perceção cromática de uma amostra é definida essencialmente pela sua tonalidade e pelo seu croma. A saturação (C) corresponde à maior ou menor monocromaticidade do vinho e a tonalidade (h) corresponde ao seu comprimento de onda dominante.

A tonalidade e o croma exprimem-se pelas coordenadas de cromaticidade a^* e b^* , que indicam dois eixos de cores antagónicas: o eixo a^* que varia de vermelho ($+a^*$) e verde ($-a^*$) e o eixo b^* que varia de amarelo ($+b^*$) a azul ($-b^*$). Para ambos os eixos, o zero indica cinzento neutro (Figura 29).

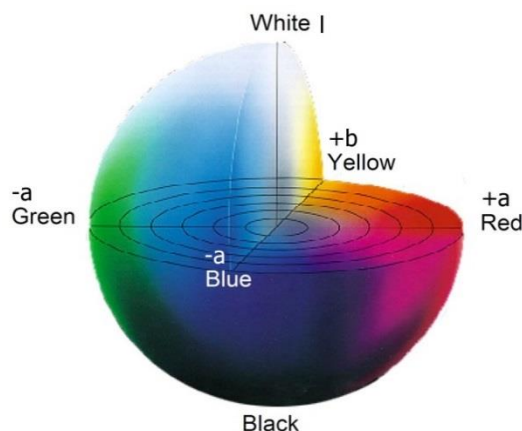


Figura 29- Círculo cromático.

Para a determinação das coordenadas do espaço CIELab procedeu-se à determinação do espectro de transmitância dos vinhos para o espectro visível de luz (360-830 nm). As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array. Cada ensaio foi realizado em triplicado e a leitura da transmitância foi feita, em relação à água desionizada, em células de vidro de 2 mm de percurso óptico.

Posteriormente, de modo a determinar os valores triestimulares (X, Y e Z) e as respetivas coordenadas L^* a^* b^* para cada vinho, foi utilizado um software desenvolvido pelo Departamento de Física da Universidade do Porto. A determinação dos valores ocorreu com a condição iluminante D65 e um ângulo do observador de 10°.

2.6.3 Análise das Antocianinas

2.6.3.1 Antocianinas Livres Totais (método do bissulfito)

As antocianinas livres reagem facilmente com o anião bissulfito dando origem a um aduto incolor. À medida que os vinhos envelhecem, as antocianinas evoluem, levando à formação de novos pigmentos mais polimerizados e mais resistentes à descoloração pelo bissulfito. A quantidade de antocianinas livres totais presente em cada amostra foi determinada através de uma adaptação do método do bissulfito descrito por Sommers e Evans em 1976.

O procedimento experimental consistiu em adicionar a um matraz 40,0 mL de HCl 2%, 2,00 mL de etanol e 2,00 mL de cada amostra de vinho. Pipetou-se para 3 tubos de ensaio 10,00 mL da solução anterior e 4,00 mL de bissulfito de sódio 20%. Num quarto tubo de ensaio foi preparada a solução de referência, de igual modo das anteriores, tendo apenas a particularidade da solução de bissulfito ter sido substituída por 4,00 mL de água desionizada. De seguida, todos os tubos foram agitados no vórtex e colocados ao abrigo da luz durante 20 minutos. Por fim, procedeu-se à leitura das absorvâncias, tendo sido feita a leitura do branco (referência) numa célula de vidro de 2mm e a absorvância da amostra numa células de vidro de percurso ótico de 10 mm. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, a um comprimento de onda de 520 nm.

A quantidade de antocianinas livres que reage foi determinada através da diferença entre a absorvância da solução de referência e a absorvância das amostras:

$$\Delta_{abs} = Abs_{referência} - Abs_{amostra}$$

O teor em antocianinas livres totais presente em cada amostra de vinho foi determinado utilizando uma reta de calibração, obtida a partir de uma gama de concentrações de soluções padrão de malvidina-3-glucósido:

$$[\text{Vinho}] \text{ (mg/L)} = (\Delta\text{abs} - 0,00024) / 0,0015$$

2.6.3.2 Quantificação de Antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLP-DAD)

Os vinhos foram analisados diretamente por HPLC (Unicam) equipado com um detetor DAD (Thermo Scientific Spectra System UV8000) por injeção direta de 20 µL de amostra, numa coluna Merck de fase reversa (C18 250 x 4,6 mm d.i.) segundo o método descrito na literatura (Oliveira *et al.*, 2006).

Os solventes utilizados foram A: H₂O/HCOOH (90:10, V/V) e B: HCOOH/CH₃CN/H₂O (10:30:60, V/V/V). A eluição decorreu com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, de acordo com o gradiente descrito na Tabela 11.

Tabela 11- Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
70	15	85
75	0	100
85	0	100
90	80	20

Todas as amostras foram analisadas em duplicado, uma vez que possuíamos triplicados reais, no entanto o controlo foi analisado em triplicado uma vez que apenas existia uma amostra real deste vinho.

O comprimento de onda a que foram obtidos os cromatogramas foi de 520 nm.

A concentração de antocianinas expressa em mg.L⁻¹, foi determinada a partir de uma reta de calibração obtida por análise de padrões de malvidina-3-glucósido.

2.7 Análise dos Flavan-3-óis

2.7.1 Fracionamento de Catequinas e Procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida em coluna de gel Toyopearl HS-40 (s)

De forma a extrair os flavan-3-óis da amostra de vinho, efetuou-se uma extração líquido-líquido. Utilizou-se aproximadamente 20,0 mL de vinho e 20,0 mL da solução extratora - acetato de etilo. Após a separação das duas fases (aquosa e orgânica), repetiu-se o processo de extração por mais três vezes (3 x 20 mL). Toda a camada aquosa foi rejeitada, ao passo que a fase orgânica, contendo os flavan-3-óis, foi evaporada à secura num evaporador rotativo sob vácuo ($\approx 30^\circ \text{C}$). O resíduo obtido foi recuperado em 2,0 mL de metanol e congelado para posterior fracionamento das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas, por cromatografia líquida em coluna.

Para cada amostra de vinho, as extrações líquido-líquido foram realizadas em duplicado.

O resíduo obtido após esta extração, foi aplicado numa coluna de gel Toyopearl HW-40 (S) (250 x 25 mm d.i.), previamente acondicionada com 99,8% metanol a um fluxo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Foram recolhidas duas frações: fração A, durante os primeiros 150 minutos de eluição e que contém os ácidos fenólicos; e a fração B, durante os 150 minutos seguintes. Esta última é correspondente à eluição da (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-galhato, das oito procianidinas diméricas (B1 à B8), do dímero B2-galhato e do trímero C1. As duas frações foram evaporadas à secura num evaporador rotativo sob vácuo, o resíduo resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de solução modelo de vinho e congelado, para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

2.7.2 Análise de Catequinas e Procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

As frações B obtidas anteriormente, foram analisadas diretamente por HPLC (Unicam) equipado com um detector DAD (Thermo Scientific Spectra System UV8000) por injeção direta de 20 μL de amostra. Utilizaram-se duas colunas de fase reversa (C18 250 x 4,6 mm d.i) alinhadas em série e termostatizadas a 25°C , de acordo com o procedimento descrito na literatura (De Freitas *et al.*, 1998).

Os solventes utilizados foram $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (97,5:2,5, V/V) - solvente A e CH_3CN /solvente A (80:20) - solvente B; e a eluição decorreu com um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, de acordo com o gradiente descrito na Tabela 12. Os cromatogramas foram obtidos ao comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 12- Gradiente de eluição utilizado na análise das catequinas e das procianidinas diméricas e triméricas.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Solvente A (%)</i>	<i>Solvente B (%)</i>
0	93	7
5	93	7
90	80	20
95	0	100
105	0	100
110	93	7

Todas as fracções A resultantes do processo de extração líquido-líquido foram analisadas em duplicado no HPLC-DAD.

A quantificação dos flavan-3-óis e das procianidinas diméricas e um trímero existentes nos vinhos, foram expressas através da reta de calibração da (+)-catequina, numa gama de concentrações entre 0 e $1,0 \text{ mg/mL}$.

2.8 Índice de Folin Ciocalteu

As análises do índice de folin ciocalteu para as amostras de vinho em contato com os três tipos de queimas de aduelas e para as amostras de vinho estagiados em barricas, realizaram-se de igual modo ao descrito no ponto 4 do capítulo I, com a única alteração do fator de diluição das amostras de vinho, ser de 50 vezes.

3 Propriedades Antioxidantes

3.1 Capacidade Antiradicalar (DPPH)

Quanto às análises realizadas para avaliar a capacidade antirradicalar das amostras de vinho em contato com os três tipos de queimas de aduelas e para as amostras de vinho estagiados em barricas, estas ocorreram de igual forma ao descrito no ponto 5.1 do capítulo I, com a única alteração do fator de diluição das amostras de vinho, ser de 50 vezes.

3.2 Avaliação do Poder Redutor (FRAP)

Para a avaliação do poder redutor das amostras de vinhos com diferentes aduelas e para as amostras de vinho estagiados em barricas, o processo também ocorre de acordo com o descrito no ponto 5.2 do capítulo I, com a única alteração do fator de diluição das amostras de vinho, ser 50 vezes.

4 Análise Sensorial

Os Vinhos em estudo foram provados por um painel de provadores constituído por 6 elementos. Foram efetuadas duas provas diferentes:

Uma prova sensorial, em que se avaliou os parâmetros da cor, das sensações olfativas e gustativas de cada amostra de vinho, através de uma ficha de prova (Anexo 1), onde os provadores podiam classificar os vinhos numa escala de 1 a 5, em que 1 corresponde a muito mau e 5 a muito bom.

Um teste triangular com 9 séries diferentes em que em cada série havia sempre uma amostra diferente e duas iguais, sendo que o que era pedido aos provadores na ficha do teste triangular (Anexo 2), era para que indicassem qual das amostras era diferente, e qual delas era a melhor.

Os vinhos em prova, foram todos identificados por um código diferente, foram servidos à temperatura ambiente (~ 22°C) e avaliados independentemente por cada um dos provadores.

5 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicado. Os valores foram expressos com médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

Estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro.

III. Resultados e Discussão

1 Análises físico-químicas

No que diz respeito à análise sumária inicial do vinho que foi transferido para as cubas e para os cascos, este apresentava os seguintes valores da Tabela 13.

Tabela 13 – Análise química inicial do vinho de mesa tinto de casta Touriga Nacional.

<i>Parâmetros</i>	<i>Valores</i>
Teor alcoólico volátil	14,65% (V/V)
Sulfuroso total	119 mg/ L
Sulfuroso livre	57 mg/ L
pH	3,80
Acidez total	6,27 g/ L
Ácido acético	0,13 g/ L
Glucose-Fructose	< 0,05 g/ L
Ácido málico	< 0.03 g/ L

1.1 Análise dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)

Começou-se por realizar uma caracterização dos ácidos fenólicos presentes na amostra de vinho de casta Touriga Nacional, usada para o estudo.

Uma vez que a matriz vinho é uma matriz muito complexa, procedeu-se à injeção da sua fração A. Esta fração A, corresponde à primeira fração recolhida no processo de fracionamento das procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida em coluna de gel toyopearl HS-40 (s), onde se encontram os ácidos fenólicos.

Esta fracção A do vinho controlo foi analisada por LC-MS em modo negativo e o cromatograma encontra-se representado na Figura 30.

Estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro.

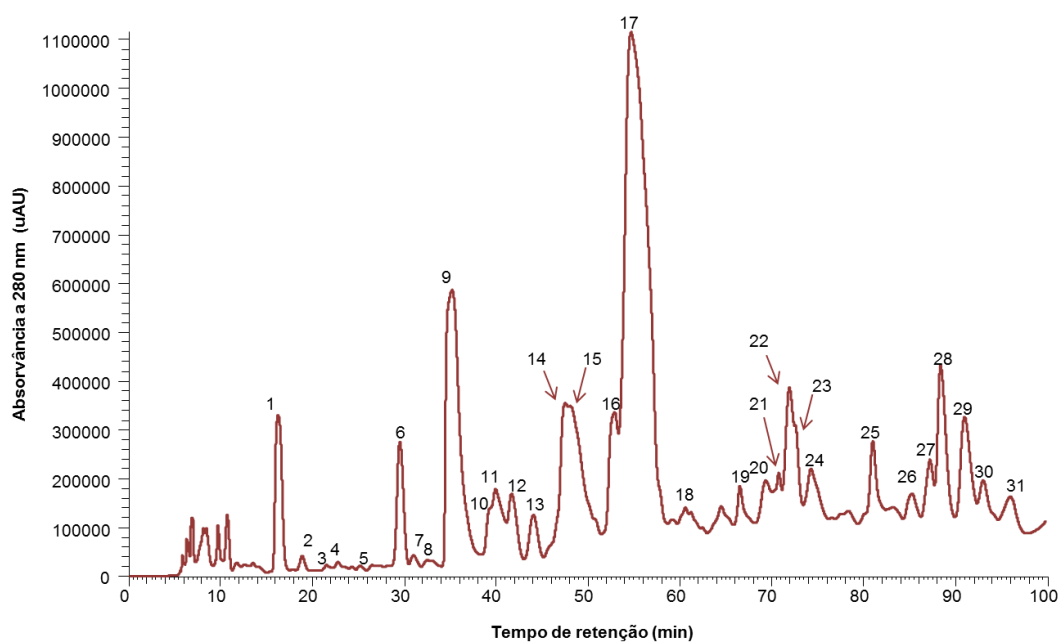


Figura 30 – Perfil cromatográfico a 280nm obtido do LC-MS correspondente à amostra de vinho Controlo, ao tempo zero.

Tabela 14 - Dados LC-MS para a amostra Controlo, ao tempo zero.

<i>Nº do pico</i>	<i>Composto</i>	<i>t_R (min)</i>	<i>[M-H]⁻ m/z</i>	<i>MS² (m/z)</i>	<i>MS³ (m/z)</i>	<i>λ_{máx}</i>
1	Ácido gálico	16,46	169 (339)	125	-	265
2	Desconhecido	18,88	323	223; 191	130; 113; 102	292
3	Desconhecido	21,52	221	130; 113;103; 87	87	289
4	Desconhecido	22,67	161	142; 128; 101	-	277
5	Desconhecido	25,25	307	207; 190	-	274
6	Desconhecido	29,51	206	134; 146; 144; 162; 187	92	256-292
7	Desconhecido	30,99	365	172; 111	-	250
8	Desconhecido	32,33	439	339; 229; 347; 329; 173; 191	229	238
9	Ácido caftarico	35,20	311 (623)	-	-	247-325
10	Desconhecido	39,24	291	190	99,07	328
11	Desconhecido	39,94	249 (499)	-	-	241-283-523
12	Cinamato de etilo	41,68	175	115; 156; 85; 113; 128	-	271
13	Desconhecido	44,05	175	129	85	253-322
14	Desconhecido	47,51	209	99; 172	-	313
15	Ácido cutárico	47,51	295 (585, 680)	163	119	310
16	Desconhecido	52,89	325	235; 264	-	529-289

17	Hemiacetal (Malvidina)	54,68	509	329; 347; 355	314	277-520
18	Desconhecido	60,62	189	128; 156; 113	85	283
19	Petunidina – aglicona	64,50	315	271	229	274
20	Galhato de etilo	69,35	197	169	125; 66	289
21	Desconhecido	70,77	165	147	-	283
22	Desconhecido	71,94	325 (650)	163; 293	130; 103	310
23	Miricetina	71,94	479	316	271; 179	307
24	Desconhecido	74,27	493	317	179	277
25	Desconhecido	81,01	449	-	-	304
26	Rutina	85,50	203 (609)	300; 463	256; 228; 273; 283; 191; 163	280
27	Desconhecido	87,24	493 (551)	331; 301	316; 179; 151	298
28	Desconhecido	88,40	477 (955)	301	179; 151	292-331
29	Desconhecido	91,01	305 (611)	-	-	259-295
30	Desconhecido	93,03	339 (679)	177; 293	102; 130	298
31	Desconhecido	95,98	641	315	300; 271	283

1.2 Análise dos aldeídos presentes no vinho por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)

Com o objetivo de analisar se o vinho de mesa tinto, após 2 meses de contato com as aduelas, apresenta compostos da madeira, realizou-se uma análise por LC-MS. Na Figura 31, encontra-se representado o cromatograma da amostra de vinho em contato com a aduela de queima forte, aos 2 meses de estágio (Vinho FOM⁺ ao T2), e o cromatograma da aduela de madeira de carvalho francês de queima forte (C.O. FOM⁺).

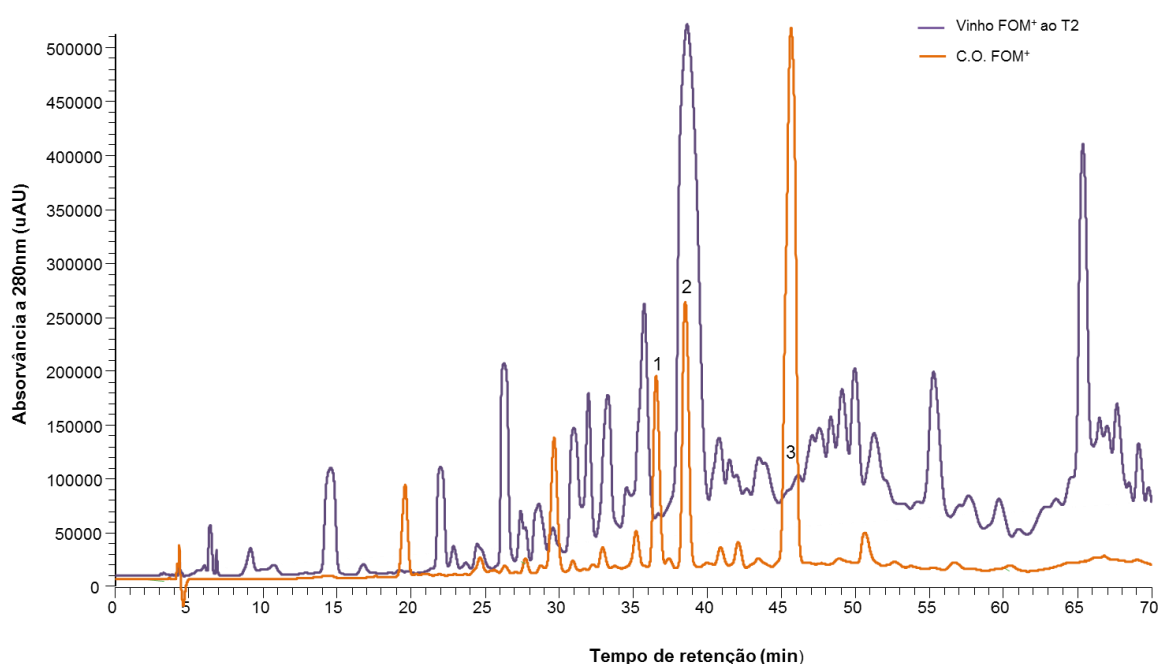


Figura 31 – Perfil cromatográfico a 280nm obtido do LC-MS, correspondente à amostra de vinho em contato com a aduela de queima forte, e da aduela de madeira de carvalho francês, aos 2 meses de estágio.

De acordo com os resultados obtidos pela Tabela 15, onde se observam as massas dos compostos e dos seus fragmentos, o espectro UV-VIS, e pela comparação com os tempos de retenção dos cromatogramas, verifica-se que três dos aldeídos presentes nas aduelas de madeira de queima forte foram encontrados no vinho que esteve em contato com esta queima, após 2 meses de estágio; sendo eles a vanilina, o siringaldeído e o sinapaldeído. Embora estes compostos se encontrem no vinho em muito pequenas quantidades, eles têm sido descritos como um importante contributo para a alteração da cor, na medida em que reagem com outros compostos, dando origem a novos pigmentos.

Tabela 15 - Dados do LC-MS para a amostra de vinho em contato com a aduela de queima forte, aos 2 meses de estágio.

Nº do pico	Composto	t_R (min)	$[M-H]^-$ m/z	MS^2 (m/z)	MS^3 (m/z)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
	Desconhecido	19,61	127	109	66; 81	283
	Desconhecido	24,67	209	-	-	256
	Desconhecido	27,72	227	114	-	304 - 325
	Desconhecido	29,66	169	141; 109	-	301 - 328
	Desconhecido	30,92	227	114	-	310
	Desconhecido	32,94	149	72	-	262 - 289
	Desconhecido	35,20	149	73; 131	-	247 - 280
1	Vanilina	36,55	153	-	-	247 - 280
2	Siringaldeído	38,52	183	155; 123	-	262 – 331
					121;149;	
3	Sinapaldeído	45,66	209	177; 191	145; 186; 131; 103	247 - 280

1.3 Índice de Fenóis Totais

Os resultados referentes ao Índice de fenóis totais (IFT) para os diferentes extratos de aduelas de madeira sujeitos a diferentes tostas ao longo do tempo, encontram-se representados na Figura 32.

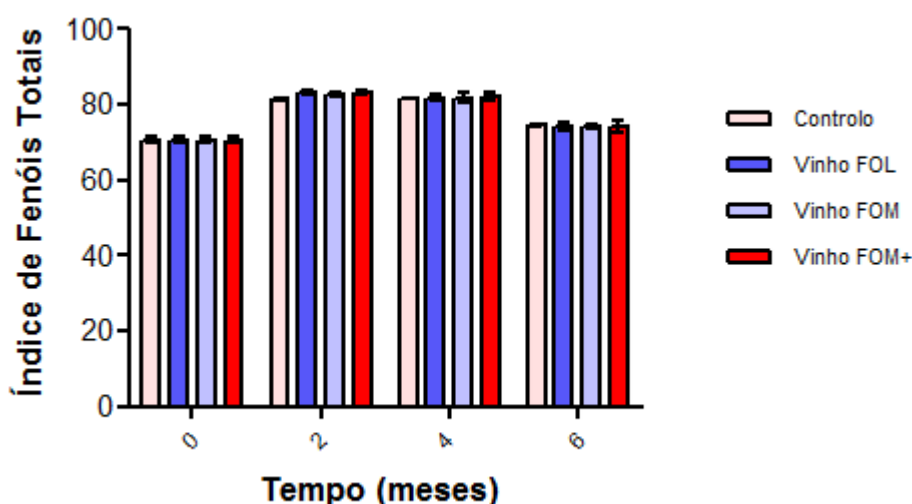


Figura 32 – Histograma do índice de fenóis totais do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Pela observação do histograma, verifica-se que ao tempo de estágio 0, 4 e 6 meses, os vinhos em contato com as aduelas sujeitas aos diversos graus de queima, não apresentam diferenças significativas entre si, no seu índice de fenóis totais. Contudo, no segundo mês, observa-se que os Vinhos FOL e FOM⁺ são aqueles que apresentam um maior índice de fenóis totais, diferenciando-se estatisticamente do vinho Controlo para o mesmo tempo.

De um modo geral, pode-se observar que o vinho ao fim de um período de 6 meses de estágio apresenta um maior índice de fenóis totais, quando comparado com o tempo 0, com $P < 0,001$.

A análise do índice de fenóis totais foi também realizada para os vinhos estagiados em barricas, ao tempo 0 e 6 meses.

Na Figura 33, observa-se os resultados do vinho estagiado com as aduelas de queima ligeira e do vinho estagiado nos cascos 62 e 69, uma vez que estes cascos apresentam o mesmo grau de queima das aduelas - queima ligeira.

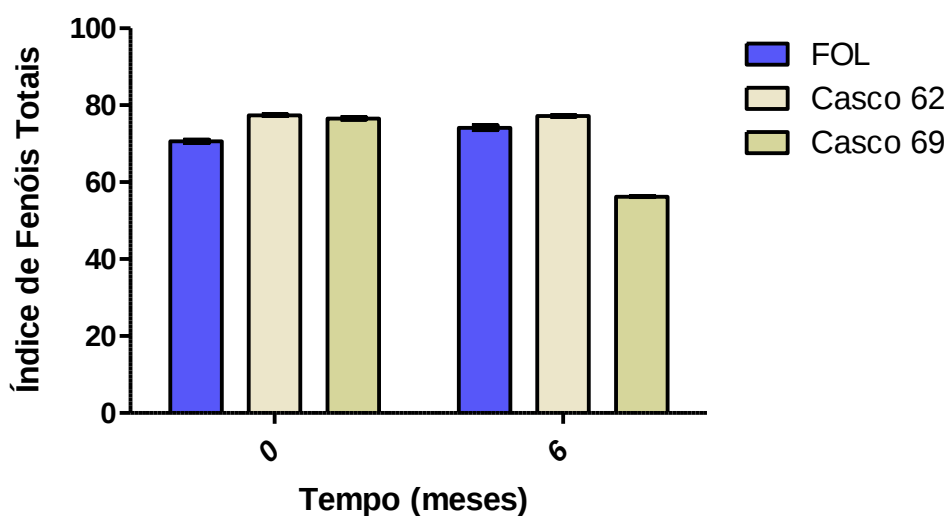


Figura 33 – Histograma do índice de fenóis totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Como se pode observar na Figura 33, o vinho estagiado nos cascos 62 e 69 ao tempo 0, apresenta um maior IFT comparativamente com o vinho estagiado em contato com as aduelas de madeira, para o mesmo tempo. Isto deve-se ao facto de quando se aplicou as aparas ao vinho que se encontrava nas cubas de inox, este mesmo vinho já permanecia há 15 dias nas barricas de madeira de carvalho francês. Desta forma, estes 15 dias de contato proporcionaram um aumento do índice de fenóis totais no vinho, devido ao facto das barricas serem novas e o forte gradiente de concentração de compostos fenólicos transferidos para o vinho, ocorrer nas primeiras semanas de estágio.

Apesar do IFT do vinho estagiado nos cascos 62 se manter inalterável durante os 6 meses de estágio, este é significativamente superior ao vinho estagiado na presença de aduelas, com $P < 0,001$.

Quanto ao IFT do vinho do casco 69, este diminui significativamente após os 6 meses de estágio, possivelmente devido à sedimentação de compostos polimerizados que se formaram durante esse tempo de estágio.

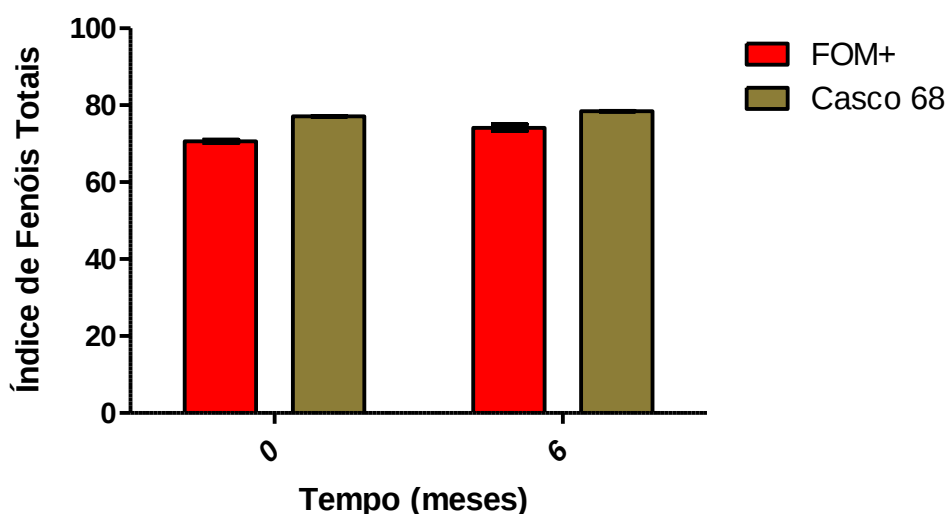


Figura 34 - Histograma do índice de fenóis totais do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

Na Figura 34, observa-se que o comportamento da aduela de madeira com queima forte e do casco 68, ao longo dos 6 meses de estágio é muito similar ao já reportado anteriormente para a aduela de madeira de queima ligeira e do casco 62. Há um aumento significativo do IFT do vinho estagiado em contato com a aduela de queima forte, após os 6 meses de estágio e mantêm-se inalterado o IFT do vinho estagiado no casco 68, ao fim dos 6 meses de estágio, sendo no entanto este valor significativamente superior ao do vinho estagiado na presença de aduelas, com $P < 0,001$.

1.4 Taninos Proantociânicos Totais

O doseamento dos taninos proantociânicos totais (TPA) baseia-se na reação de decomposição destes compostos em meio ácido e por ação do calor (reação Bate-Smith), medindo-se a absorvância das soluções resultantes a 520 nm. Os valores médios obtidos para cada amostra estão representados na Figura 35.

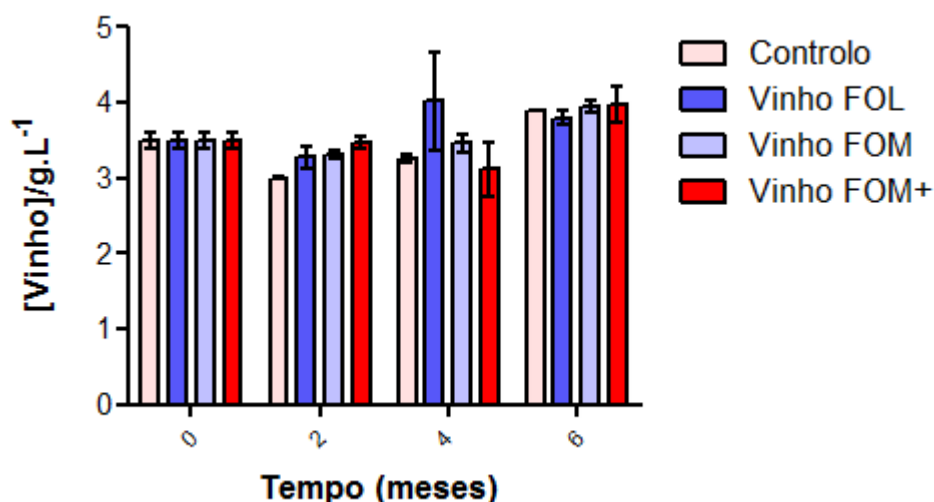


Figura 35 – Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho controle e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Tal como aconteceu em outras análises, também aqui, não foram encontradas diferenças significativas entre os vinhos sujeitos a diferentes graus de tosta.

De um modo geral, e não considerando o resultado obtido para a amostra FOL no 4º mês, pode-se verificar que a tendência observada nos vinhos ao longo do tempo é aquela que era esperada, um aumento do grau de polimerização com o tempo.

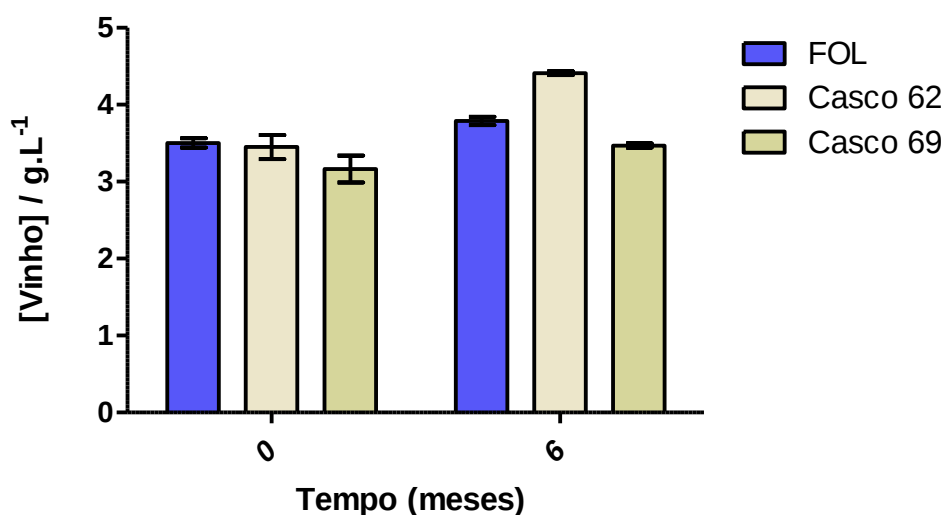


Figura 36 - Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Observando a Figura 36, verifica-se que independentemente do tipo de envelhecimento, com aduelas ou cascos, há um aumento significativo do teor de taninos

proantociânicos totais presentes no vinho, ao fim de 6 meses de estágio. Estes resultados correlacionam-se com a formação de compostos estruturalmente mais complexos, resultantes das reações de polimerização entre compostos fenólicos da madeira e do vinho, nomeadamente compostos como a catequinapirílio que resultam da reação entre a catequina e o sinapaldeído – aldeído presente na madeira de carvalho francês (Sousa. C., *et al* 2005); ou apenas, entre compostos fenólicos do vinho.

Seria expectável que as amostras dos cascos 62 e 69 originassem valores mais elevados de taninos proantociânicos totais comparativamente com os das aduelas, visto que a cinética de extração dos compostos fenólicos das barricas/ cascos, é mais elevada quando comparada com a das aduelas; contudo isso só se verificou no casco 62.

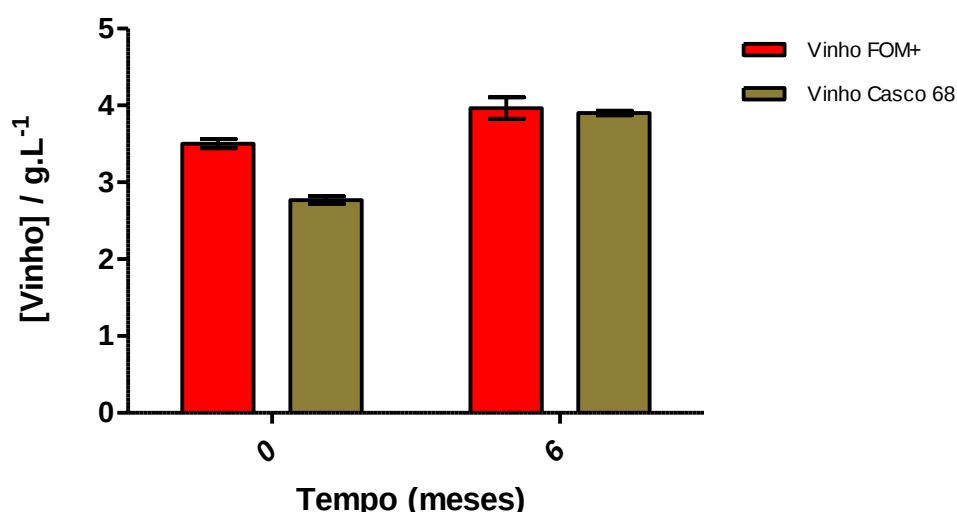


Figura 37 - Histograma dos taninos proantociânicos totais do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05

Na Figura 37, verifica-se que independentemente do tipo de envelhecimento, com aduelas ou cascos, houve um aumento significativo do teor de taninos proantociânicos totais presentes no vinho, após os 6 meses de estágio, devendo-se este comportamento às reações de polimerização entre compostos fenólicos da madeira e do vinho. Embora ambos os vinhos apresentem um elevado teor de TPA, não são observadas diferenças estatisticamente significativas entre o vinho FOM+ e o vinho do casco 68.

1.5 Poder Tanante

Os taninos do vinho possuem a capacidade de interagirem com as proteínas salivares formando complexos insolúveis, propriedade que está na origem da sensação de adstringência. A proteína ASB (Albumina Sérica Bovina) tem sido utilizada como modelo para estudar a capacidade tanante dos taninos em matrizes alimentares.

O poder tanante dos vinhos foi determinado por nefelometria e os resultados dos valores médios obtidos para cada amostra estão representados na Figura 38.

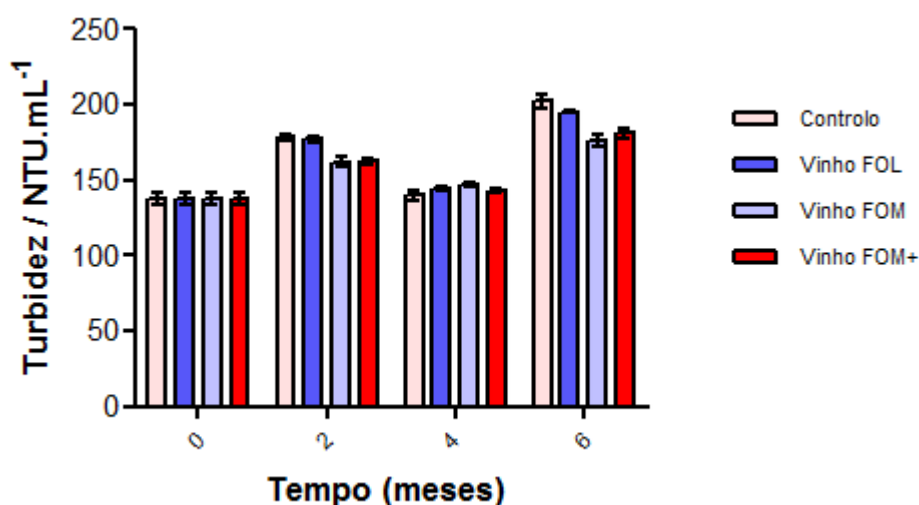


Figura 38 – Histograma do poder tanante do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Os resultados obtidos para o poder tanante dos vinhos, seguem a mesma tendência que os apresentados anteriormente para as análises dos taninos proantociânicos totais, aumentando ao fim de um período de 6 meses de estágio.

Através da análise da Figura 38, verifica-se que as amostras do Controlo e do Vinho FOL se diferenciam estatisticamente dos Vinhos FOM e FOM⁺, ao 2º e 6º mês, apresentando um poder tanante superior. As amostras de vinho em contato com um nível de tosta mais baixa, ou sem tosta, apresentam estruturas de taninos condensados mais simples, comparativamente com as amostras de vinho em contato com as outras aduelas de queima média e forte. Além disso, vários autores afirmam que a elevada polimerização das estruturas de procianidinas ($DP > 70$), ou seja, as estruturas de taninos condensados mais polimerizados, apresentam uma menor flexibilidade, traduzindo-se numa maior dificuldade de se ligarem às proteínas, embora sejam capazes de

estabelecer ligações com ela, e daí um menor valor de poder tanante resultante (De Freitas and Mateus, 2001).

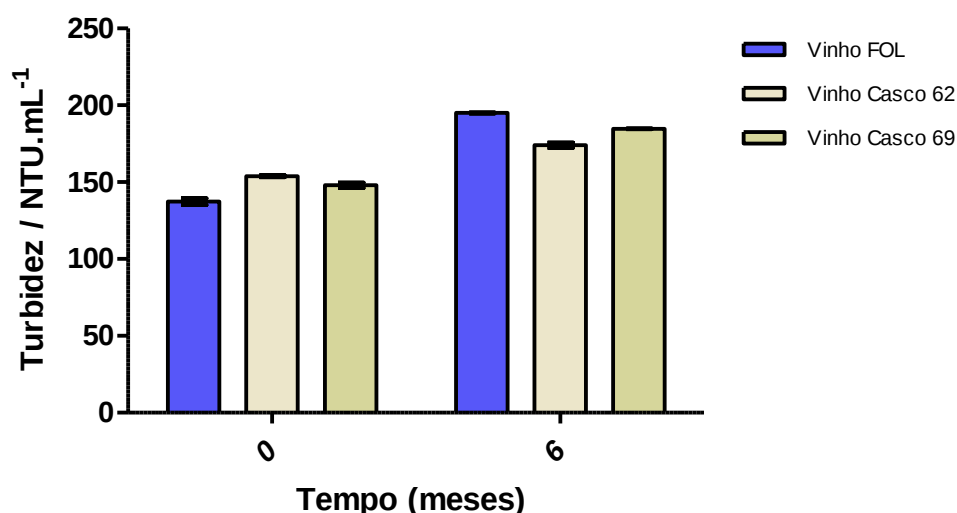


Figura 39 - Histograma do poder tanante do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Neste estudo, são evidentes as diferenças entre a utilização de aduelas e barricas (Figura 39 e Figura 40). Independentemente do grau de queima, o uso de barricas durante o período de estágio do vinho, levou a um menor aumento do seu poder tanante, comparativamente com o uso de aduelas, o que se traduz numa inferior sensação de adstringência. Este fenómeno pode dever-se ao processo de micro-oxigenação decorrente dos poros da madeira, nas barricas/cascos, que proporciona o arredondamento quer dos taninos extraídos da madeira quer dos taninos da uva, no decorrer das reações de polimerização. Assim sendo, a formação destes taninos estruturalmente mais complexos (taninos poliméricos), são mais facilmente sedimentados e consequentemente apresentam uma menor capacidade de interagir com as proteínas.

No vinho estagiado com as aduelas, a cinética de extracção dos compostos fenólicos é mais baixa, quando comparada com os cascos, o que se traduz numa menor polimerização das estruturas de proantocianidinas, prevalecendo as estruturas mais simples, mais fáceis de interagir com as proteínas, e daí resultar um maior teor do poder tanante para estas amostras.

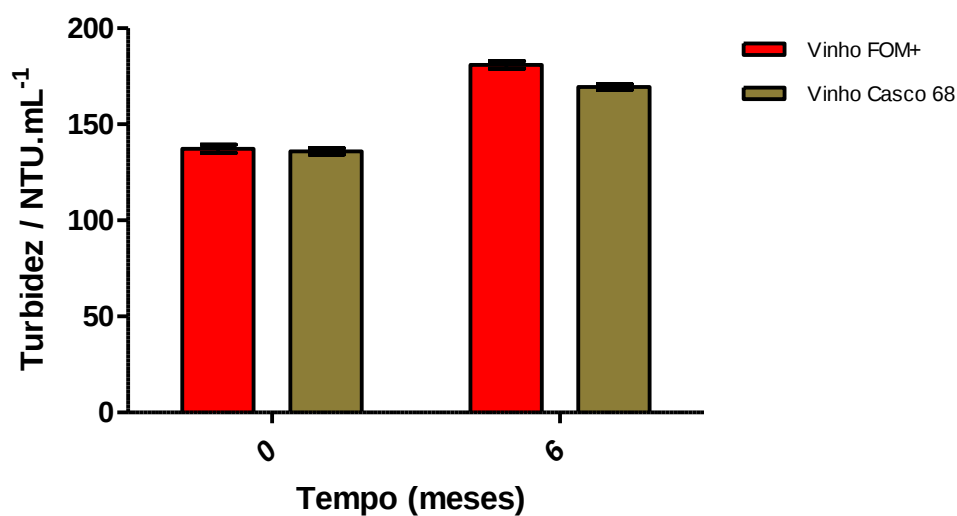


Figura 40 - Histograma do poder tanante do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

1.6 Índice de Diálise

O índice de diálise (I.D) permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos fenólicos presentes num vinho. Os valores médios obtidos para cada amostra são apresentados na Figura 41.

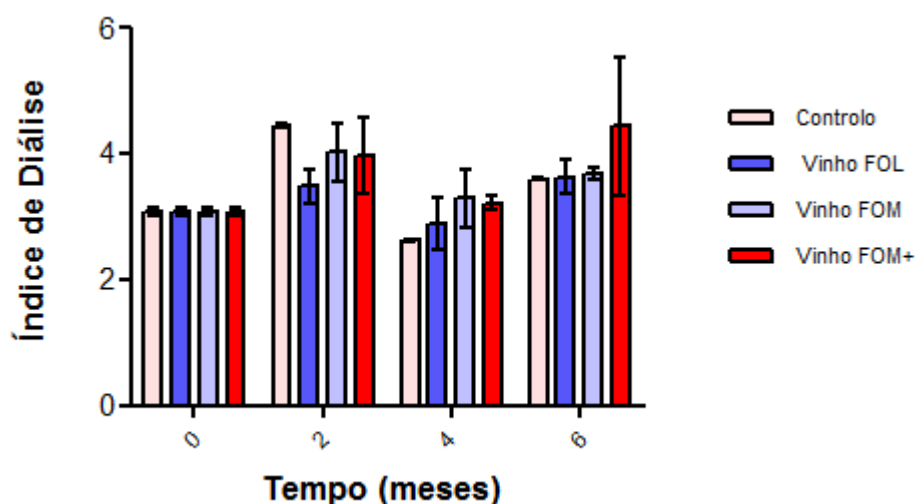


Figura 41 – Histograma do índice de diálise do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

O índice de Diálise, vem também comprovar aquilo que já tem sido dito ao longo das várias análises, com o decorrer do processo de envelhecimento do vinho, observa-se um aumento dos compostos estruturalmente mais complexos. Após os 6 meses de estágio, o tipo de tosta que apresenta ter um maior efeito no índice de diálise é a FOM⁺, e de acordo com a análise estatística realizada através da análise de variância a um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparação entre os grupos indica que existe diferenças significativas entre esta e o Controlo, para o mesmo tempo. Este elevado efeito da aduela de queima forte (FOM⁺) no parâmetro do Índice de Diálise pode dever-se à sua composição, que leva ao aumento da polimerização, não só de taninos como também de antocianinas.

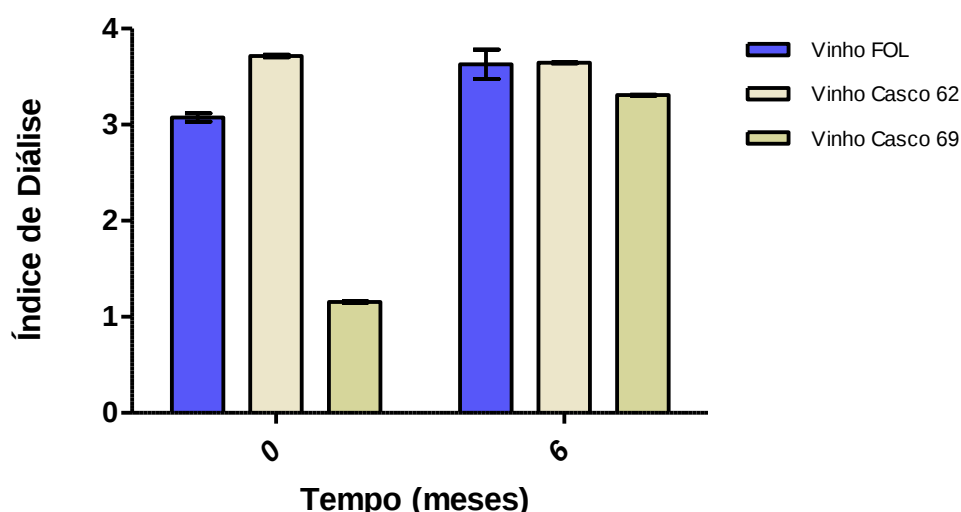


Figura 42 - Histograma do índice de diálise do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. P <0,05

O estudo comparativo entre o vinho em contato com a aduela de queima ligeira e o vinho do casco 62, mostra que não existem diferenças significativas entre eles ao fim de um período de 6 meses de estágio, o que leva a que a escolha de um processo ou de outro, para esta análise, seja indiferente.

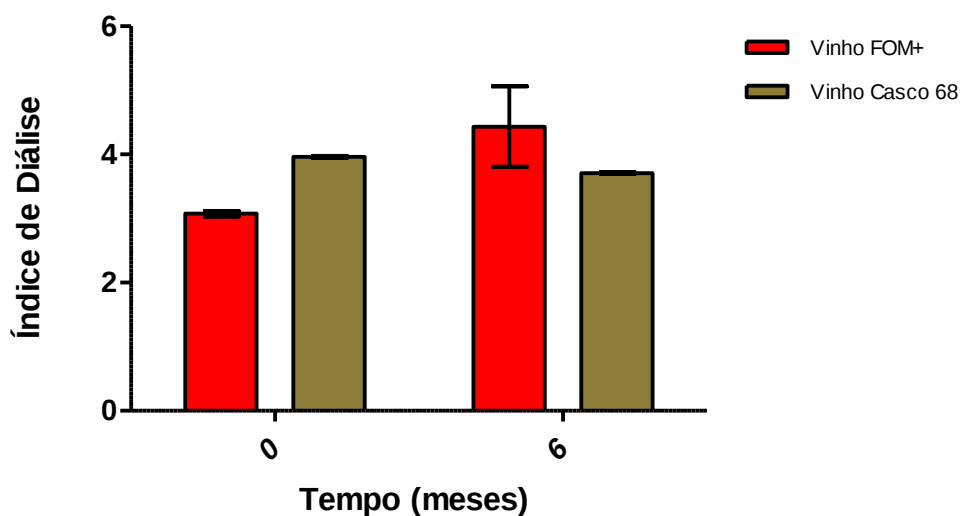


Figura 43 - Histograma do índice de diálise do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

Paralelamente ao estudo anterior, também aqui se observou que para o grau de tosta forte o vinho estagiado nas aduelas era aquele que contribuía com maior efeito para um aumento da complexidade estrutural dos compostos fenólicos presentes no vinho, quando comparado com o vinho envelhecido no casco, após os 6 meses de estágio.

1.7 Análise da Cor

1.7.1 Intensidade Corante

A determinação da intensidade corante (IC) é efetuada pela soma das absorvâncias aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm.

A Figura 44 evidencia o comportamento dos vinhos analisados relativamente à intensidade corante.

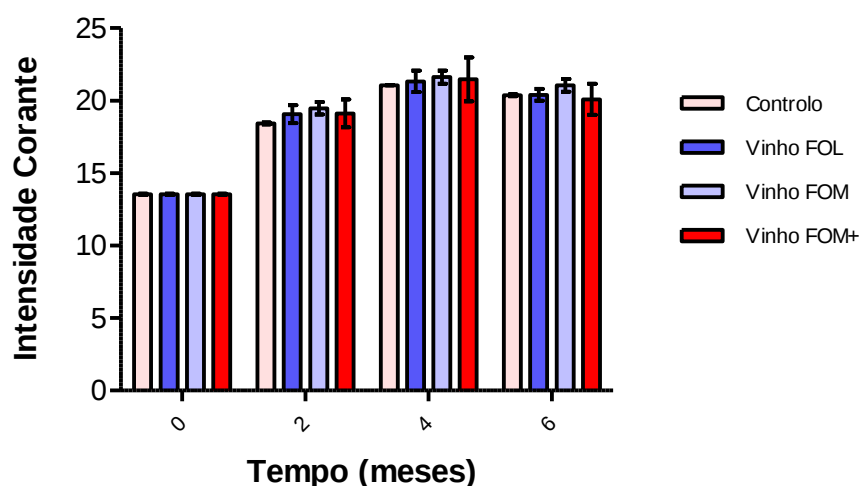


Figura 44 – Histograma da intensidade corante do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

A intensidade corante dos vinhos tintos em estudo, ao longo dos 6 meses de estágio, apresenta valores compreendidos entre 13 e 21. Comparando as diversas amostras entre si, testemunha e amostras com aduelas, é possível verificar que os valores obtidos são semelhantes, não tendo existido influência do grau de tosta no parâmetro em análise. Do tempo 0 para o 4º mês constata-se um acréscimo significativo da IC em todas as amostras, sendo uma das possíveis explicações, a interação das antocianinas com outras moléculas presentes no vinho através de fenómenos de co-pigmentação e/ou auto-associação, levando à formação de novos pigmentos derivados de antocianinas, compostos estes mais estáveis, que estabilizam a intensidade corante do vinho (Pérez-Magariño *et al.*, 2009). Esta estabilização da cor é observada na passagem do 4º para o 6º mês, que consequentemente se traduz numa conservação da intensidade corante do vinho.

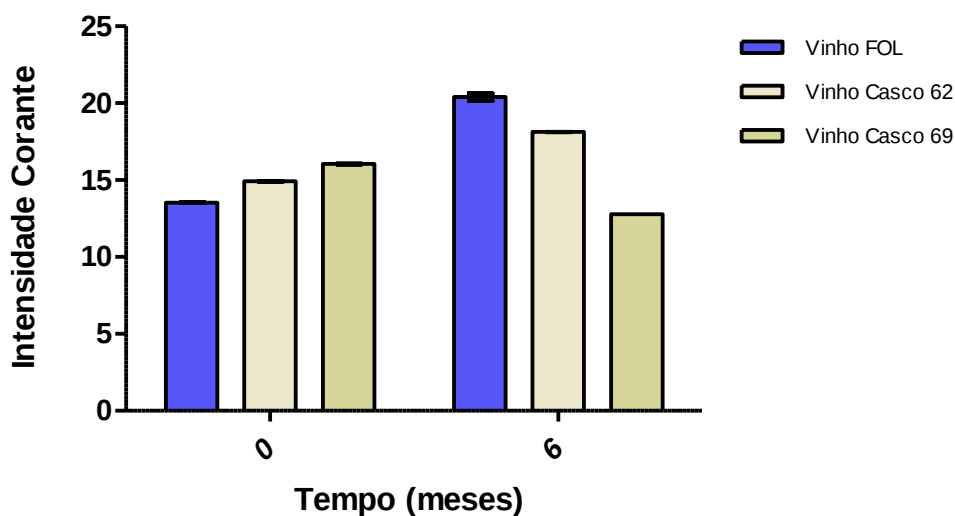


Figura 45 - Histograma da intensidade corante do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Paralelamente ao observado na análise do poder tanante, também aqui na Figura 45 e Figura 46, se verifica as evidentes diferenças entre a utilização de aduelas e barricas. Independentemente do grau de queima, o uso de barricas durante o período de estágio do vinho, levou a um menor aumento da sua IC, comparativamente com o uso de aduelas. Este fenómeno pode dever-se às trocas gasosas que ocorrem através dos poros/fissuras, entre as várias aduelas que constituem a barrica, ou ainda aquando das trasfegas e atestos periódicos. Este processo induz uma constante dissolução do oxigénio no vinho, proporcionando a ocorrência de várias reações redox, que irão formar compostos instáveis, que posteriormente precipitam e levam a uma diminuição da IC.

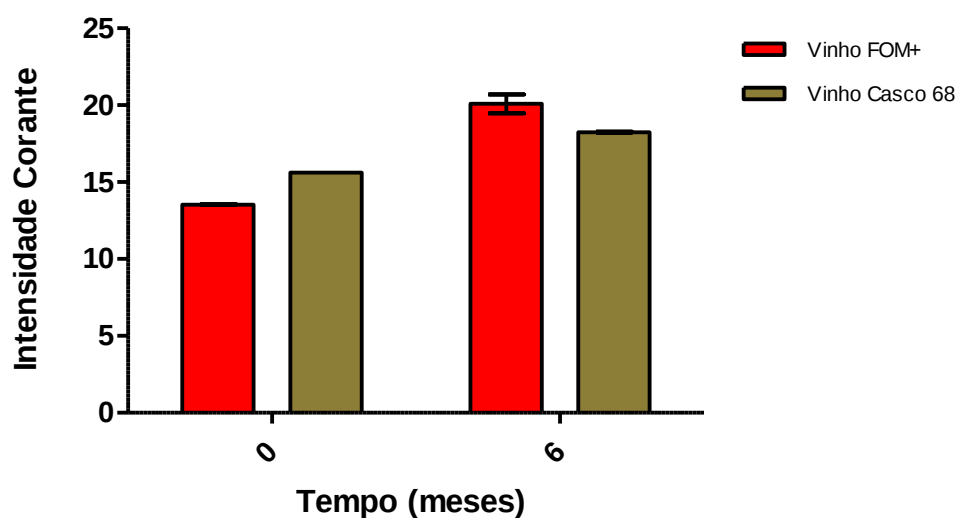


Figura 46 - Histograma da intensidade corante do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

1.7.2 CIELab

A análise dos componentes colorimétricos dos vinhos em estudo foi efetuada por determinação dos parâmetros CIELab. Este sistema tem sido proposto como o novo padrão OIV, para a determinação da cor dos vinhos.

Os resultados dos valores médios obtidos para cada amostra estão reunidos na Tabela 16.

Tabela 16 – Parâmetros colorimétricos do vinho Controlo, do vinho em contato com as diferentes aduelas e do vinho estagiado nos cascos.

Tempo (meses)	Vinho	L*	a*	b*	C*	h*	ΔC^*	ΔH^*	ΔE^*
0	Controlo	87,70	13,69	0,16	13,69	0,68			
	Controlo	88,70	12,37	0,85	12,39	3,94	-1,29	2,18	1,80
	Vinho FOL	88,43	12,62	0,78	12,65	3,51	-1,04	1,91	1,47
	Vinho FOM	88,33	13,09	0,89	13,12	3,90	-0,57	1,33	1,19
	Vinho FOM⁺	88,50	12,53	0,83	12,56	3,75	-1,13	1,73	1,62
6	Vinho Casco 62	89,00	11,96	-1,04	12,00	355,37	-1,68	2,52	2,48
	Vinho Casco 68	89,00	12,73	-0,87	12,75	356,10	-0,93	1,88	1,92
	Vinho Casco 69	92,00	9,47	0,26	9,47	1,56	-4,21	1,69	6,02

De um modo geral, verifica-se que o estágio do vinho por um período de 6 meses em contato com aduelas de madeira ou em barricas induz a alterações nas componentes colorimétricas analisadas. Contudo, os diferentes graus de queima das aduelas não parecem ter influência nestes parâmetros em análise.

Observando os valores da luminosidade (L^*), verifica-se que os vinhos estagiados nos cascos são os que apresentam um maior valor médio de L^* , comparativamente com os vinhos estagiados com as aduelas, o que parece sugerir uma maior luminosidade e claridade da cor destes vinhos. Pode-se concluir que os resultados obtidos para o parâmetro L^* estão de acordo com o esperado, um aumento de L^* é acompanhado por um decréscimo da intensidade corante, e nos resultados obtidos na análise da Intensidade Corante, os cascos foram os que apresentaram valores mais baixos.

Da análise da Tabela 16, constata-se ainda, que os vinhos estagiados em cascos são os que apresentam menores valores médios de a^* , traduzindo-se numa menor predominância da cor vermelha; e apresentam valores negativos para a coordenada cromática b^* , manifestando-se num desvio da cor no sentido da tonalidade azul.

Para avaliar a diferença de coloração do vinho controlo ao tempo 0 com os vinhos estagiados nas aduelas e nas barricas aos 6 meses, analisou-se o parâmetro ΔE^* . Este parâmetro, mede a distância total entre as duas cores referidas, num espaço tridimensional. Quanto às unidades de ΔE^* , estas foram concebidas de modo a que o valor de 1 fosse igual à menor diferença suscetível de ser visualmente perceptível. Assim sendo, aos 6 meses de estágio verifica-se que quer o vinho controlo, quer os vinhos com as aduelas e em cascos, apresentam uma notável diferença da cor visualmente perceptível, quando comparados com o vinho controlo ao tempo 0. Verifica-se que as amostras onde visualmente é mais perceptível a diferença da cor, é nos cascos, uma vez que os valores de ΔE^* são muito superiores a 1, garantindo desta forma essa diferença.

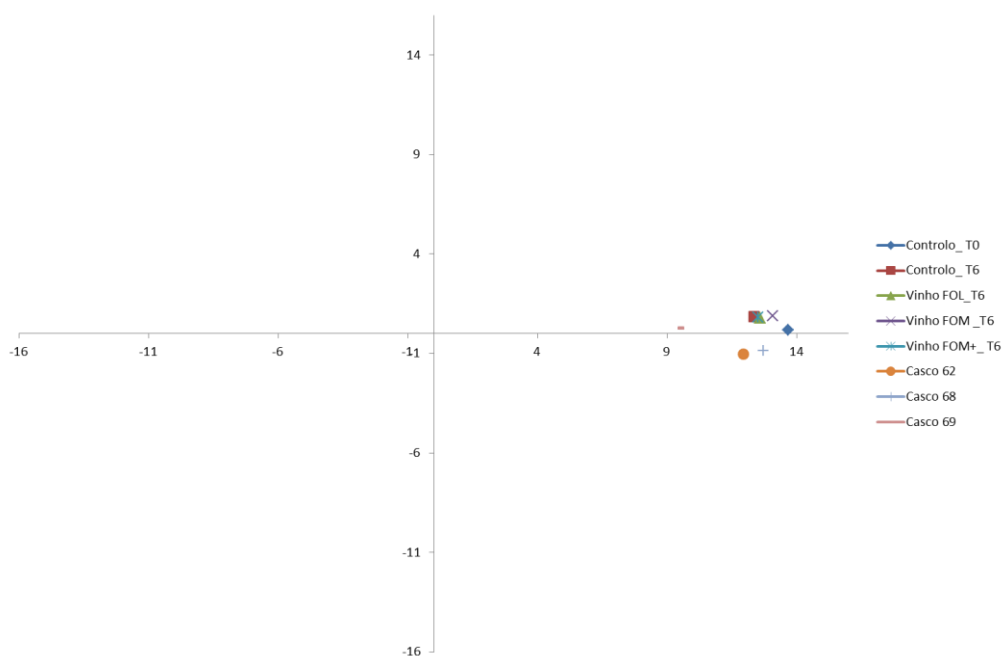


Figura 47 – Gráfico correspondente aos parâmetros a^* e b^* do vinho controlo, vinho em contato com as diferentes aduelas e vinho estagiado nos cascos.

Em conclusão, verifica-se que o vinho estagiado nos cascos é aquele que apresenta uma maior influência nos diversos parâmetros colorimétricos analisados, quando comparados com as aduelas (Figura 47).

1.7.3 Antocianinas

1.7.3.1 Antocianinas Livres Totais

Em vinhos novos, a fração dos pigmentos vermelhos corresponde, na sua maioria, a antocianinas livres que reagem facilmente com o bissulfito dando origem a adutos incolores, descolorando a solução. No entanto, à medida que o vinho envelhece, as antocianinas evoluem e dão origem a novos pigmentos (pigmentos polimerizados), mais resistentes ao bissulfito.

A análise das antocianinas livres totais foi feita pelo método do bissulfito, e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 48.

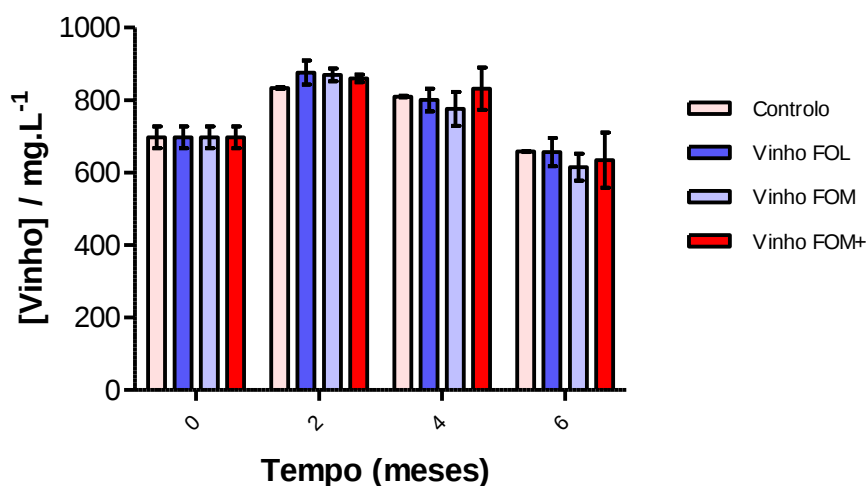


Figura 48 – Histograma das antocianinas livres totais do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Observando a Figura 48, verifica-se que as aduelas de madeira não tiveram qualquer tipo de influência no teor de antocianinas livres totais, uma vez que, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as várias amostras dos vinhos em contato com as aduelas de diferentes graus de queima e o controlo, aos vários meses de análise.

É visível o aumento da concentração das antocianinas livres totais ao 2º e 4º mês de análise, sendo que esta ocorrência pode dever-se a uma elevada quantidade de antocianinas livres, ainda presentes nos vinhos jovens; à auto-associação das antocianinas e copigmentação com outros fenóis também presentes no vinho. Contudo, é importante salientar que durante o processo de envelhecimento dos vinhos as

antocianinas participam em inúmeras reações de condensação e polimerização, resultando numa diminuição do teor de antocianinas livres totais, como é visível do 4º para o 6º mês.

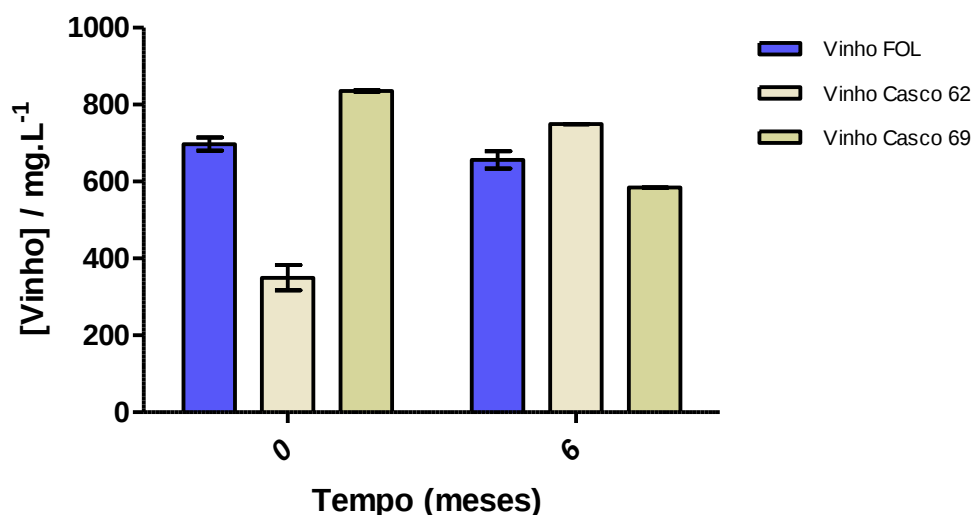


Figura 49 - Histograma das antocianinas livres totais do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Na análise da Figura 49, desprezando o resultado obtido para o vinho do casco 62 ao tempo 0, verifica-se que ocorre uma diminuição do teor de antocianinas livres totais no vinho estagiado no casco 69, ao fim de um período de 6 meses de contato. Esta diminuição é visivelmente acentuada, e pode ter origem da incorporação de pequenas quantidades de oxigénio, através dos poros das barricas, que promove um conjunto de alterações, nomeadamente a associação de antocianinas aos taninos condensados.

No que se refere, ao teor de antocianinas livres totais presentes na amostra de vinho em contato com as aduelas de queima ligeira (vinho FOL), verifica-se que esta permanece igual à existente no tempo zero, não existindo assim diferenças estatisticamente significativas entre estes dois tempo – 0 e 6 meses.

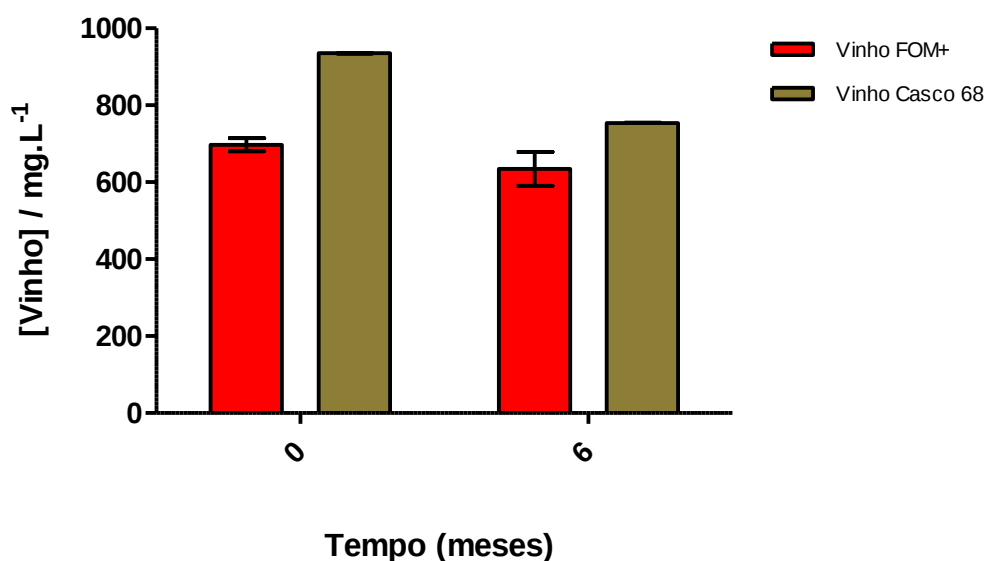


Figura 50 - Histograma das antocianinas livres totais do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. P < 0,05

Observando o histograma das antocianinas livres totais representado na Figura 50, verifica-se que o vinho estagiado em contato com as aduelas de queima forte (vinho FOM⁺), segue a mesma tendência que a amostra de vinho em contato com as aduelas de queima ligeira representada no gráfico anterior; não havendo nenhuma alteração no teor de antocianinas livres totais, do tempo zero para os 6 meses de estágio. Quanto ao comportamento do vinho envelhecido no casco 68 este é muito similar ao reportado para o vinho envelhecido no caso 69.

1.7.3.2 Antocianinas Monoglucósidas

Ao longo do processo evolutivo de um vinho, as antocianinas monoméricas vão sendo transformadas, dando origem a novos pigmentos.

Na Figura 51, encontra-se representado o cromatograma de HPLC, obtido pela análise das antocianinas 3-monoglucósidas, das amostras de vinho em contato com as aduelas de queima forte ao tempo 0 (Vinho FOM⁺ ao T0) e ao 6º mês (Vinho FOM⁺ ao T6), e do vinho estagiado no caso 68 ao 6º mês (Vinho casco 68 ao T6).

Uma vez que o perfil cromatográfico obtido é semelhante ao dos restantes vinhos estagiados com as outras tostas, decidiu-se representar apenas um dos três tipos de queimas, tendo sido escolhida, a queima forte.

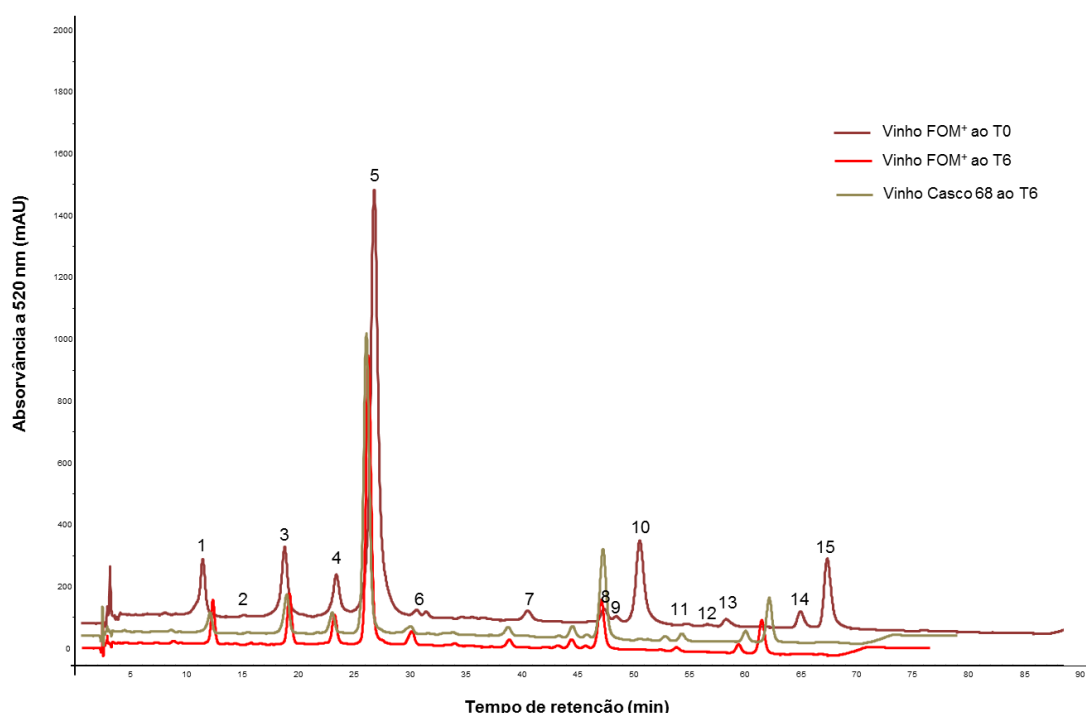


Figura 51 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes no vinho em contato com aduelas de queima forte e no vinho estagiado no casco 68, aos 0 e 6 meses de estágio.

Legenda:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1: 3-glucósido de delphinidina | 9: 3-cumaroílglicosido de delphinidina |
| 2: 3-glucósido de cianidina | 10: 3-acetilglucósido de malvidina |
| 3: 3-glucósido de petunidina | 11: 3-cumaroílglicosido de cianidina |
| 4: 3-glucósido de peonidina | 12: 3-cafeoilglucósido de peonidina |
| 5: 3-glucósido de malvidina | 13: 3-cumaroílglicosido de petunidina |
| 6: 3-acetilglucósido de delphinidina | 14: 3-cumaroílglicosido de peonidina |
| 7: 3-acetilglucósido de petunidina | 15: 3-cumaroílglicosido de malvidina |
| 8: 3-acetilglucósido de peonidina | |

A visível diminuição do tamanho dos picos cromatográficos do tempo 0 para os 6 meses (Figura 51), traduz-se numa diminuição da concentração das antocianinas presentes no vinho, que resulta dos processos de evolução do mesmo, onde as antocianinas vão sendo transformadas noutros compostos mais polimerizados. Este comportamento pode também ser observado, nos resultados apresentados na Figura 52.

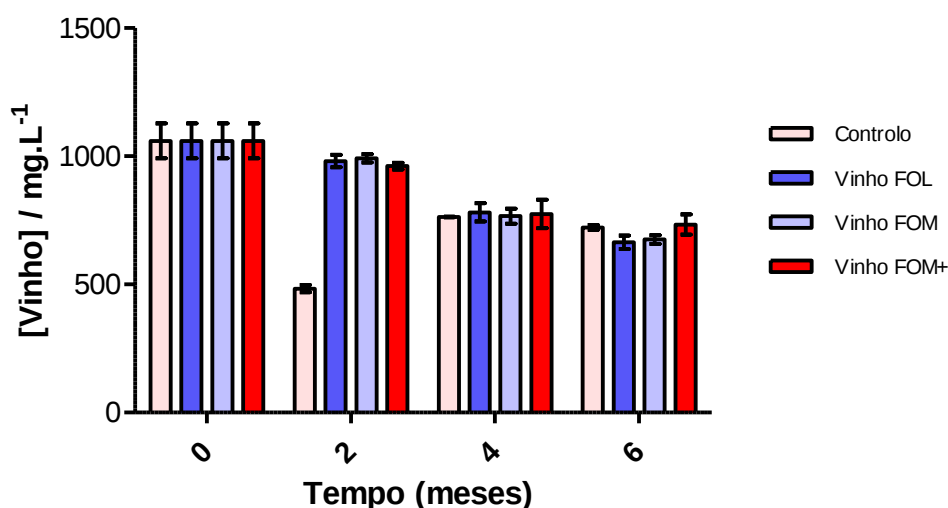


Figura 52 – Histograma das antocianinas monoméricas do vinho controle e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Descartando o resultado apresentado para a amostra do vinho controle ao 2º mês de estágio, observamos que de uma forma geral, as antocianinas monoméricas diminuem ao longo dos 6 meses de estágio. Também aqui, não se observam diferenças estatisticamente significativas na influência do grau de tosta, nos diversos meses de análise.

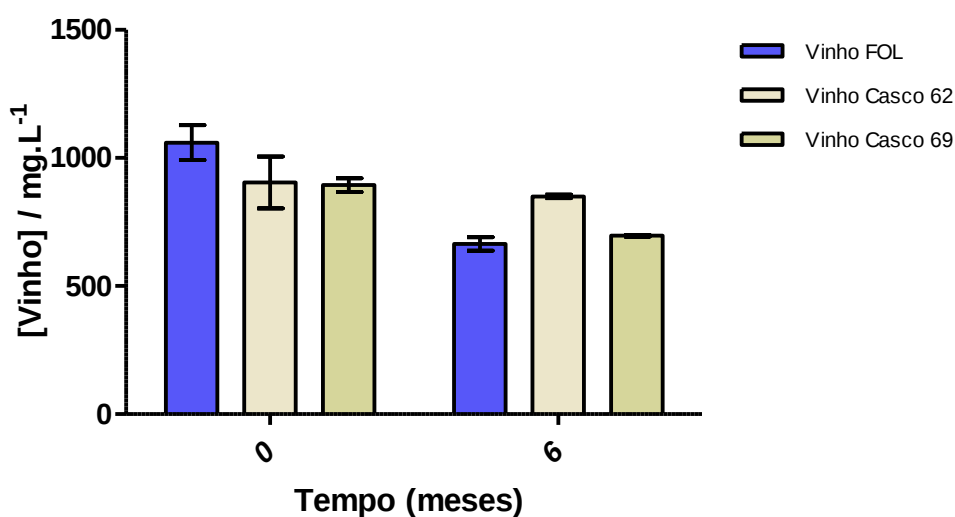


Figura 53 - Histograma das antocianinas monoméricas do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Pela análise da Figura 53, observa-se que os resultados observados para o 6º mês, são semelhantes ao comportamento das antocianinas livres totais, tal como era esperado; e verifica-se que a maior estabilização das antocianinas monoglucósidas é dada pelos cascos, uma vez que são eles que apresentam maiores teores de antocianinas monoglucósidas

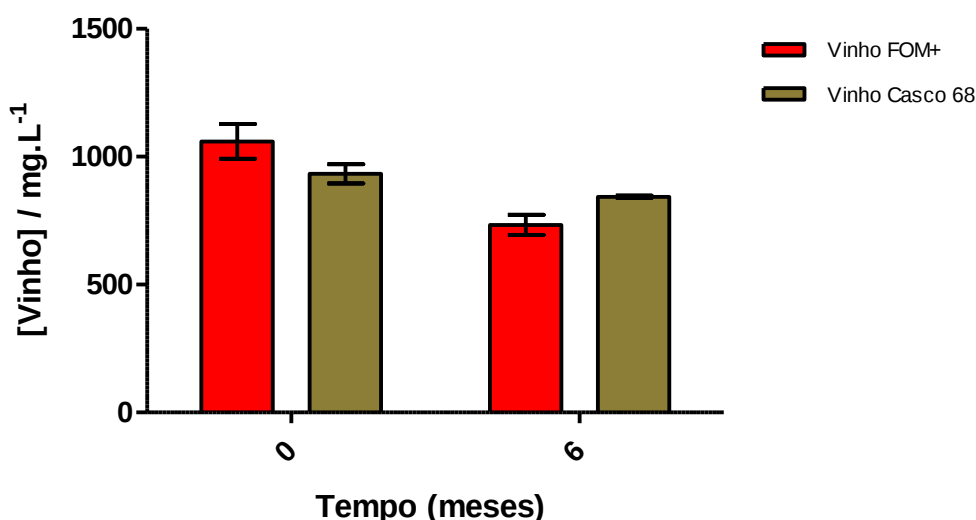


Figura 54 - Histograma das antocianinas monoméricas do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05

Também aqui na Figura 54, os resultados obtidos após os 6 meses de estágio, seguem a mesma tendência que os observados na análise das antocianinas livres totais.

1.8 Análise dos Flavan-3-óis

A Figura 55 representa o cromatograma de HPLC, obtido pela análise das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas presentes nas amostras de vinho em contato com as aduelas de queima forte ao tempo 0 (Vinho FOM⁺ ao T0) e ao 6º mês (Vinho FOM⁺ ao T6), e do vinho estagiado no caso 68 ao 6º mês (Vinho casco 68 ao T6).

Uma vez que o perfil cromatográfico obtido é semelhante ao dos restantes vinhos estagiados com as outras tostas, decidiu-se apenas representar um dos três tipos de queimas, tendo sido a escolhida, a queima forte.

É importante referir que, as amostras que foram analisadas por HPLC-DAD, correspondiam às frações B, de cada um dos vinhos. Estas frações B, correspondem à segunda fração recolhida no processo de fracionamento das procianidinas por

cromatografia líquida em coluna de gel toyopearl HS-40 (s), onde se encontram todas as procianidinas existentes no vinho.

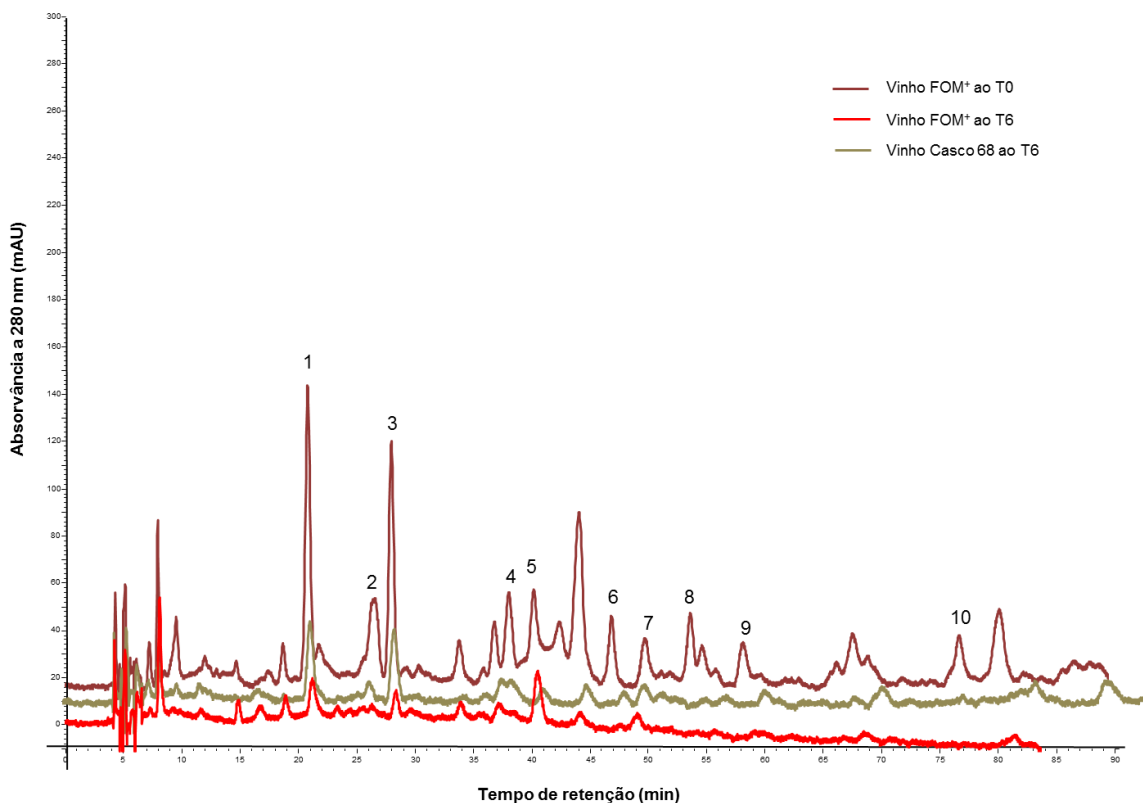


Figura 55 – Cromatograma de HPLC-DAD correspondente às frações B do vinho em contato com aduelas de queima forte e do vinho estagiado no casco 68, aos 0 e 6 meses de estágio. $P < 0,05$

Legenda:

- | | |
|------------------|------------------------------|
| 1: Dímero B1/B3 | 6: (-)-Epicatequina |
| 2: Dímero B4 | 7: Trímero C1 |
| 3: (+)-Catequina | 8: Dímero B2-galhato |
| 4: Dímero B2 | 9: Dímero B7 |
| 5: Dímero B8 | 10: (-)-Epicatequina-galhato |

A visível diminuição da área dos picos cromatográficos do tempo 0 para os 6 meses (Figura 55), traduz-se numa diminuição da concentração das procianidinas presentes no vinho, que resulta dos processos de evolução do mesmo, onde as procianidinas vão reagindo com outros compostos, dando origem a compostos com um maior grau de polimerização que não são detetados no método de HPLC-DAD utilizado. Contudo, a

espetrometria de massa seria uma técnica alternativa para a determinação das procianidinas oligoméricas e poliméricas. Outro dos fatores que pode levar à diminuição do teor de procianidinas é o facto destes compostos mais polimerizados poderem também precipitar. Este comportamento pode ainda ser observado, nos resultados apresentados na Figura 56.

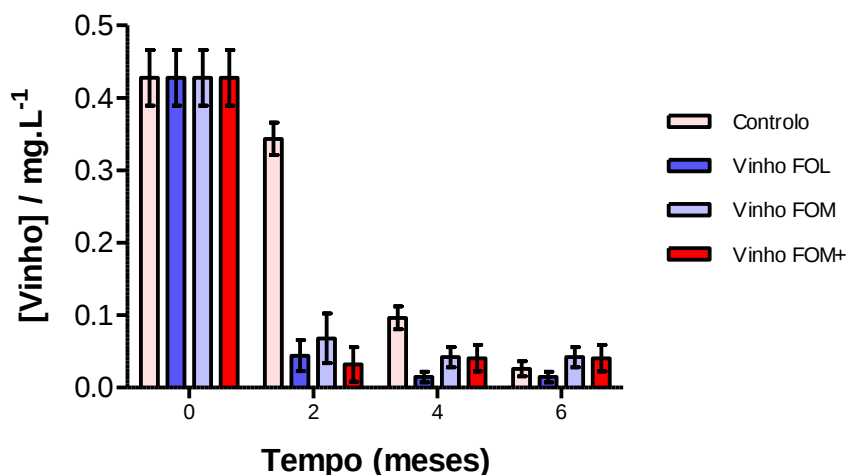


Figura 56 – Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Pela análise da Figura 56 verifica-se que aqui é visível o efeito do grau de tosta das diversas aduelas, no teor das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas do vinho. No 2º e 4º mês de estágio, observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o vinho controlo e o vinho em contato com as aduelas de madeira.

Se nos focarmos no 2º mês, e apenas nas amostras de vinho em contato com as aduelas, observamos que a aduela de queima ligeira e média são as que apresentam um maior teor em catequinas e taninos proantocianicos totais, sendo que esta última difere estatisticamente da aduela de queima forte. Este resultado não está de acordo com o esperado, uma vez que a aduela de queima média é a que apresenta maior concentração de aldeídos totais, logo o esperado seria que este vinho em contato com esta aduela, apresenta-se um menor teor de catequinas e procianidinas devido à maior probabilidade da ocorrência das reações entre estes dois compostos – catequina e aldeído.

Para o 4º e 6º mês, observando apenas as amostras em contato com as aduelas, verificamos que as aduelas de queima média e forte são as que apresentam um maior

teor em catequinas e procianidinas diméricas e triméricas, e que diferem estatisticamente da amostra de vinho em contato com a aduela de queima ligeira, com $P < 0,05$.

No 2º e 4º mês de estágio, é bem visível a influência da madeira no teor de catequinas e procianidinas do vinho, uma vez que os vinhos envelhecido em contato com as aduelas apresentam valores muito baixos de catequinas e procianidinas diméricas e triméricas, comparativamente com a amostra testemunha. Esta rápida diminuição destes compostos pode estar associada à presença dos aldeídos da madeira. Várias famílias de novos pigmentos, a partir de aldeídos da madeira, têm sido encontradas em vinhos, tais como pigmentos derivados de catequina-pirílio, mais conhecidas como Oaklinas que resultam da reação entre a catequina presente no vinho e os aldeídos cinâmicos presentes na madeira de carvalho francês. As duas oaklinas conhecidas são o SCP que deriva do sinapaldeído e o GCP que resulta da reacção com o coniferaldeído (De Freitas *et al* 2004; Sousa *et al* 2005).

Da polimerização e precipitação das procianidinas diméricas e triméricas durante o período de estágio, resulta uma perda de adstringência do vinho, que se traduz na obtenção de vinhos mais suaves/macios e arredondados.

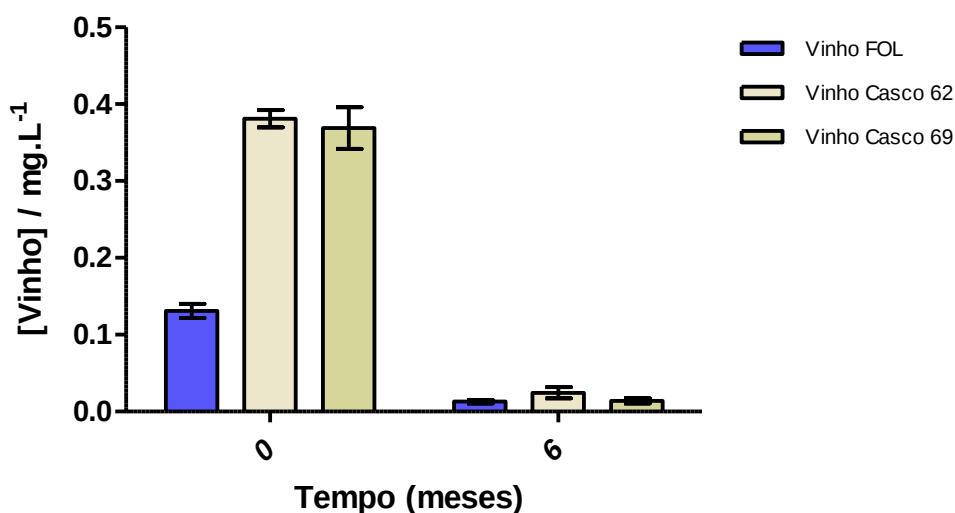


Figura 57 - Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas presentes no vinho FOL e no vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Pela observação da Figura 57, concluímos que após os 6 meses de estágio, há uma elevada diminuição do teor de catequinas e procianidinas diméricas e triméricas no vinho em contato com as aparas e nos vinhos envelhecidos nos cascos, tal como era

esperado, uma vez que durante o período de contato com a madeira ocorrem reações entre a catequina e os aldeídos da madeira, levando assim a uma diminuição destes compostos ao longo do tempo. Observa-se ainda que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estas três amostras, para os 6 meses de estágio. A oxidação do etanol a etanal pode também contribuir para o aumento do grau de polimerização das procianidinas e assim levar a uma diminuição da sua deteção ao longo do tempo, mesmo em vinhos que não foram envelhecidos em contato com aduelas ou barricas, como é o caso do controlo, ainda que essa diminuição seja mais lenta (Figura 56).

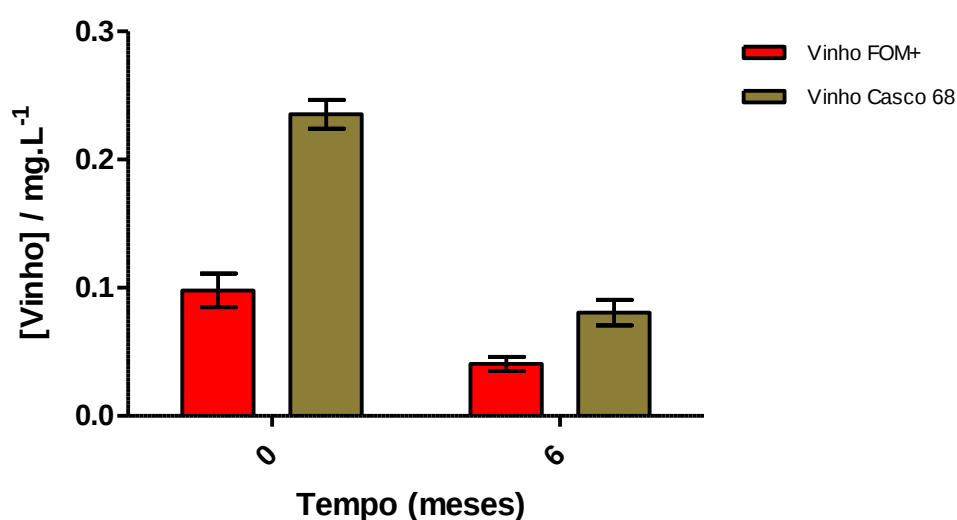


Figura 58 - Histograma das catequinas e procianidinas diméricas e triméricas presentes no vinho FOM⁺ e no vinho do casco 68. P < 0,05

Tal como já foi referenciado anteriormente, também aqui na Figura 58 ocorreu uma diminuição do teor de catequinas e procianidinas diméricas e triméricas para a amostra de vinho FOM⁺ e para o vinho do casco 68, após os 6 meses de estágio.

1.9 Índice de Folin Ciocalteu

Os resultados obtidos na avaliação do Índice de Folin Ciocalteu dos vinhos estão representados na Figura 59.

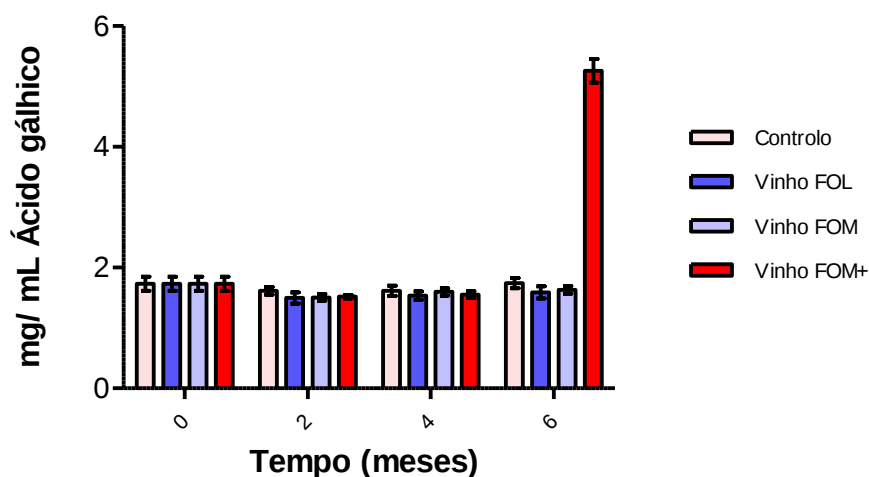


Figura 59 – Histograma do índice de folin ciocalteu do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

De um modo geral, na avaliação do índice de folin ciocalteu para os vários meses de estágio (Figura 59), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o vinho testemunha e os vinhos em contato com as aduelas de diferentes graus de tosta. Contudo, no 6º mês verifica-se que a aduela de queima forte apresenta um comportamento muito diferente das restantes tostas, tendo este resultado sido associado a um erro de execução do método analítico, pois não se encontra mais nenhuma explicação válida para esse resultado.

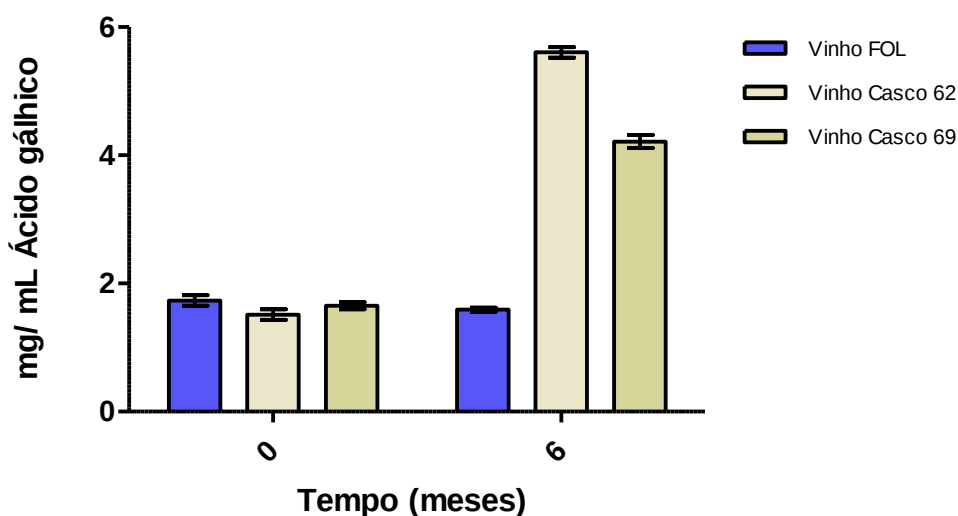


Figura 60 - Histograma do índice de folin ciocalteu do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Na avaliação do índice de folin ciocalteu em vinhos estagiados com aduelas ou em cascos, de queima ligeira (Figura 60), observou-se que após os 6 meses de estágio, as aduelas não apresentavam qualquer tipo de influência neste parâmetro, tal como já tinha sido referido em cima, contrariamente aos cascos que apresentam uma elevada influência. Apesar de ambos os cascos apresentarem o mesmo grau de queima, o casco 62 é o que apresenta o valor significativamente mais elevado, para este parâmetro. Este resultado está em concordância com o obtido pelo índice de fenóis totais, uma vez que também aqui o casco 62 apresenta valores mais elevados que o caso 69, o que significa que esta amostra contém uma elevada concentração de compostos fenólicos.

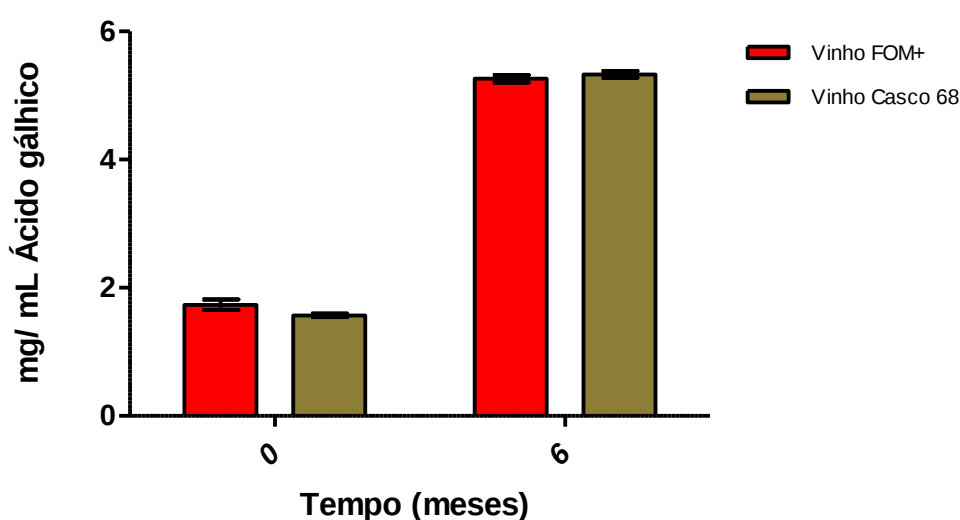


Figura 61 - Histograma do índice de folin ciocalteu do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

Quanto à avaliação do índice de folin ciocalteu do vinho em contato com a aduela e com o casco, para o grau de queima forte (Figura 61), observa-se para ambos, um significativo aumento deste parâmetro após os 6 meses de estágio. No entanto, pensa-se que o resultado obtido para o vinho em contato com a aduela de queima forte (vinho FOM⁺) ao 6º mês não estará correto, uma vez que se afasta muito dos resultados obtidos quer para os restantes meses anteriores, quer para os outros graus de tosta.

2 Análise das Propriedades Antioxidantes

Atualmente sabe-se que a capacidade antioxidante dos vinhos aumenta aquando do contato com a madeira de carvalho.

De modo a estudar as propriedades antioxidantes do vinho de mesa da casta Touriga Nacional em contato com as aduelas e os cascos, que apresentam diferentes graus de queima, procedeu-se à utilização do radical livre estável DPPH para avaliar a capacidade antiradicalar (capacidade de sequestrar radicais livres) e procedeu-se à utilização do método FRAP para avaliar o poder redutor.

2.1 Capacidade Antiradicalar (DPPH)

Os resultados obtidos na avaliação da capacidade antiradicalar dos vinhos estão representados na Figura 62.

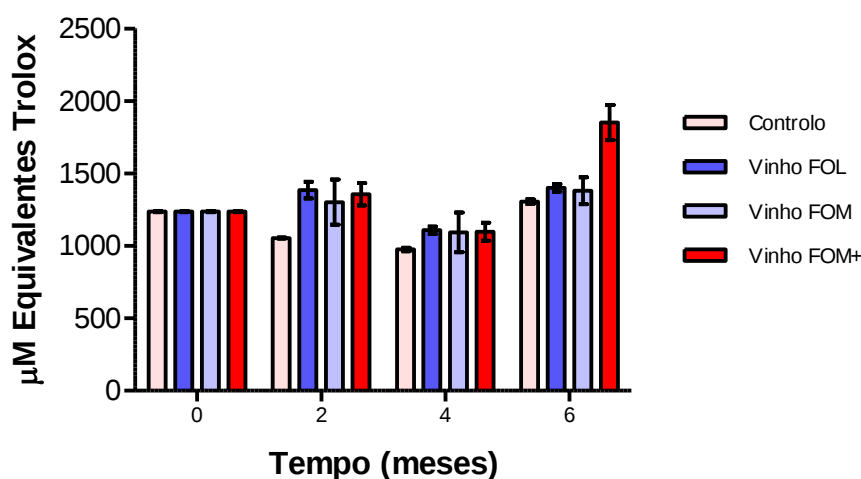


Figura 62 – Histograma da capacidade antiradicalar do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Pela observação da Figura 62, podemos concluir que a presença da madeira no vinho, influencia a sua capacidade antiradicalar uma vez que os vinhos estagiados com as aduelas com diferentes graus de queima, apresentam ao 2º e 4º mês de estágio valores significativamente mais elevados, do que o vinho controlo.

Em relação ao 6º mês, verifica-se que o vinho estagiado com as aduelas de tosta forte (vinho FOM⁺) apresenta um comportamento diferente dos restantes vinhos estagiados com as outras tostas; facto este que não se encontra de acordo com o esperado, uma vez que quando se avaliou a capacidade antiradicalar das madeiras, a madeira FOL era a que apresentava o maior valor de DPPH, comparativamente com os de outras madeiras diferentemente tostadas. O que parece concluir que, este elevado valor de DPPH para o vinho estagiado com as aduelas de queima forte, não se deva

apenas da influência da madeira, mas também de outros parâmetros decorrentes durante o período de estágio.

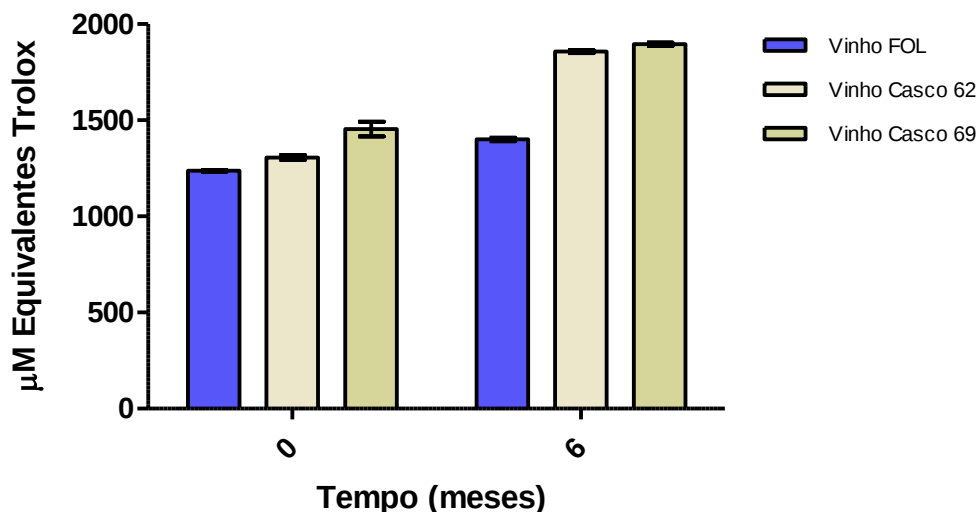


Figura 63 - Histograma da capacidade antiradicalar do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Relativamente à capacidade antiradicalar observada, após os 6 meses de estágio, para as aduelas e para os cascos com o grau de tosta ligeira (Figura 63), verifica-se que os cascos apresentam valores significativamente mais elevados, do que as aduelas. Este comportamento pode estar associado à presença de estruturas mais simples nos cascos, uma vez que estas permitem o suporte do eletrão desemparelhado, como resultado da deslocalização do sistema electrónico dos anéis benzénicos, apresentando consequentemente uma maior eficiência antiradicalar, comparativamente com as estruturas mais polimerizadas.

A presença maioritária dos compostos estruturalmente mais simples nos cascos é evidente uma vez que, os cascos para além de promoverem uma rápida polimerização dos compostos fenólicos promovem também uma rápida sedimentação/precipitação dos mesmos, permanecendo assim, ao fim dos 6 meses, os compostos mais simples em solução.

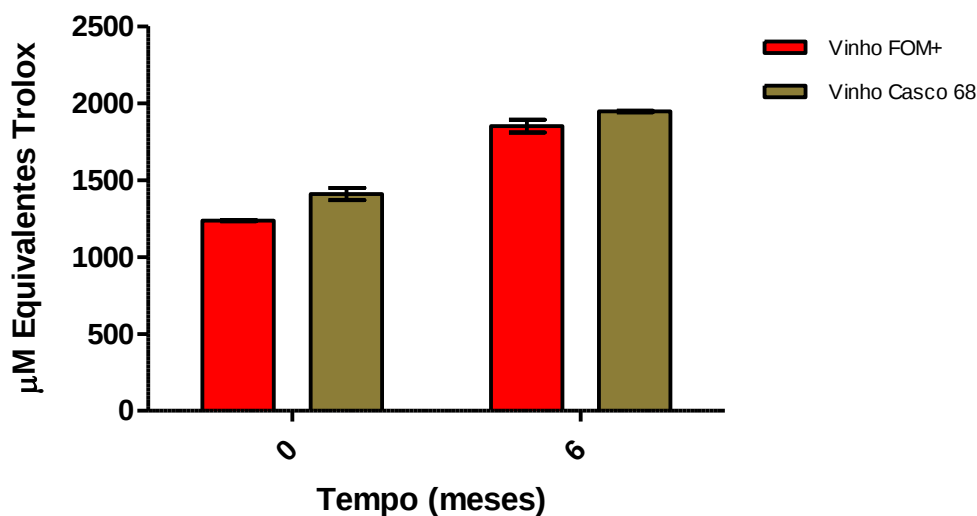


Figura 64 - Histograma da capacidade antiradicalar do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. $P < 0,05$

Como se pode observar na Figura 64, a capacidade antiradicalar do vinho estagiado com as aduelas de queima forte e do vinho estagiado no casco com o mesmo grau de queima, aumenta ao fim de um período de 6 meses de estágio. No entanto, não são observadas diferenças estatisticamente significativas entre estes dois processos de estágio.

2.2 Avaliação do Poder Redutor (FRAP)

Os resultados obtidos na avaliação do poder redutor dos vinhos estão representados na Figura 65.

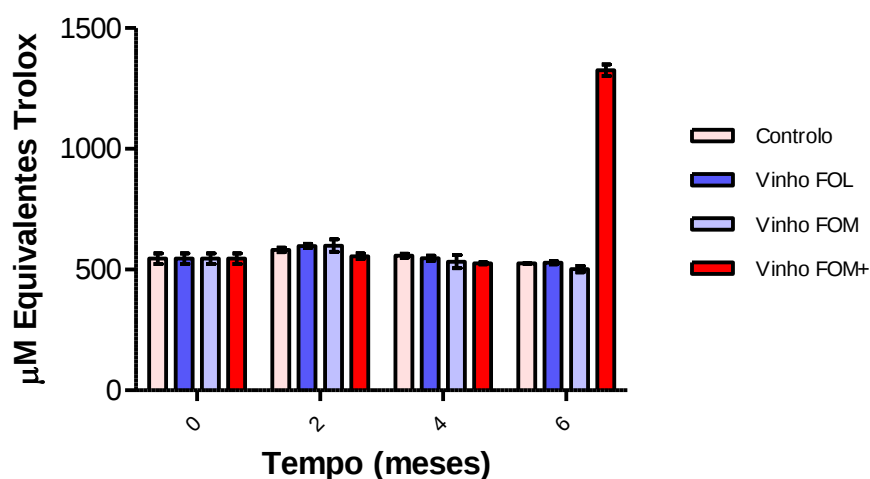


Figura 65 – Histograma do poder redutor do vinho controlo e do vinho em contato com as aduelas de madeira sujeitas a diferentes queimas. $P < 0,05$

Tal como se observou na análise do Índice de Folin Ciocalteu, também aqui na avaliação do poder redutor (Figura 65), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o vinho testemunha e os vinhos em contato com as aduelas de diferentes graus de tosta; e o estranho comportamento da aduela de queima forte (vinho FOM⁺) ao 6º mês, também foi o mesmo que o representado nesse parâmetro.

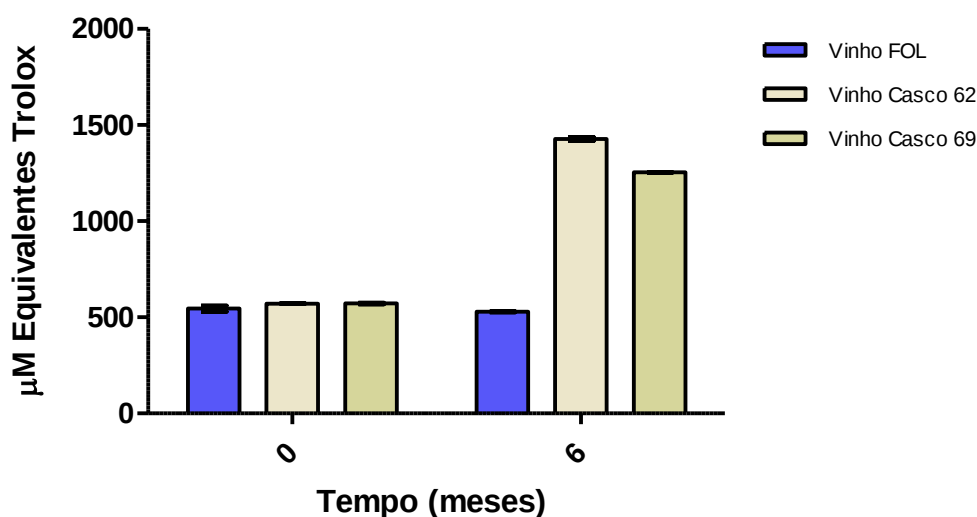


Figura 66 - Histograma do poder redutor do vinho FOL e do vinho dos cascos 62 e 69. $P < 0,05$

Na avaliação do poder redutor dos vinhos em contato com as aduelas e os cascos de queima ligeira (Figura 66), observa-se que após os 6 meses de estágio, as aduelas não

têm qualquer influência neste parâmetro, tal como já tínhamos visto em cima, contrariamente aos cascos que apresentam uma elevada influência. Apesar de ambos os cascos apresentarem a mesmo grau de queima, o caso 62 é o que apresenta o valor significativamente mais elevado, para o parâmetro do poder redutor. No entanto, isto não se encontra de acordo com o esperado, pois como o casco 62 apresenta um maior Índice de diálise, um maior Índice de fenóis totais e uma maior concentração de taninos proantociânicos totais, ou seja, uma maior complexidade estrutural, logo seria de esperar que houvesse uma diminuição do poder redutor. Pois o aumento da complexidade estrutural reflecte-se na perda gradual de capacidade de complexação de iões metálicos (Gaulejac *et al.*, 1999). Assim, seria de esperar que o vinho que apresentasse uma maior capacidade de quelatar iões metálicos seria o do casco 69, pelo facto de possuir estruturas menos complexas, comparativamente com o casco 62.

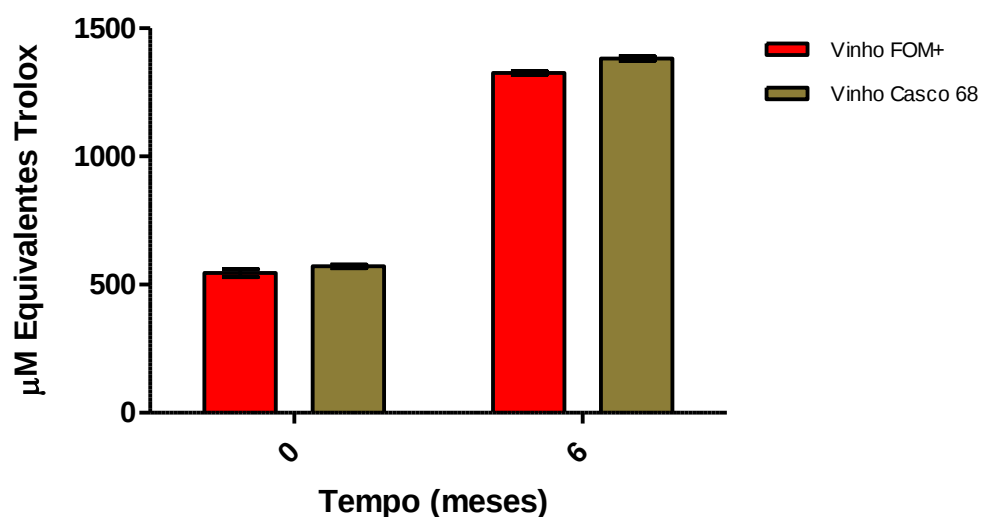


Figura 67 - Histograma do poder redutor do vinho FOM⁺ e do vinho do casco 68. P <0,05

Quanto à avaliação do poder redutor do vinho em contato com a aduela e com o casco, para o grau de queima forte (Figura 67), observa-se para ambos, um significativo aumento deste parâmetro após os 6 meses de estágio. No entanto, pensa-se que o resultado obtido para o vinho em contato com a aduela de queima forte (vinho FOM⁺) para o 6º mês não estará correto, uma vez que se afasta muito dos resultados obtidos quer para os restantes meses anteriores, quer para os outros graus de tosta.

3 Análise Sensorial

A análise sensorial dos vinhos foi realizada ao fim de 10 meses de estágio. Para a prova sensorial foram avaliados três parâmetros, nomeadamente o parâmetro da cor e das sensações olfativas e gustativas de cada amostra de vinho.

Na Figura 68, encontram-se representados os resultados obtidos pela prova sensorial, para o parâmetro da cor.

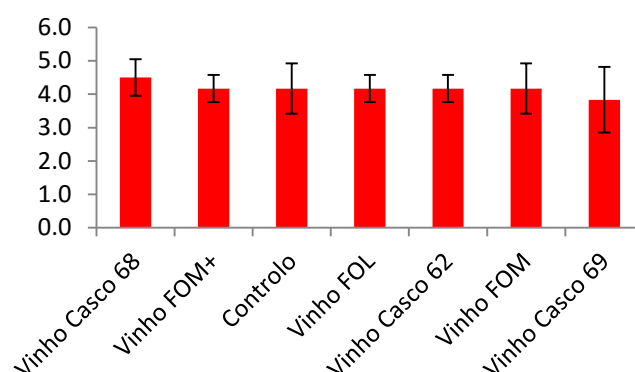


Figura 68 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da cor.

Relativamente às características sensoriais da cor, verifica-se que para a maioria dos provadores, todos os vinhos se apresentam com boa cor, uma vez que as pontuações dadas se encontram acima dos 4 valores.

Os resultados obtidos para o parâmetro da sensação olfativa, encontram-se representados na Figura 69.

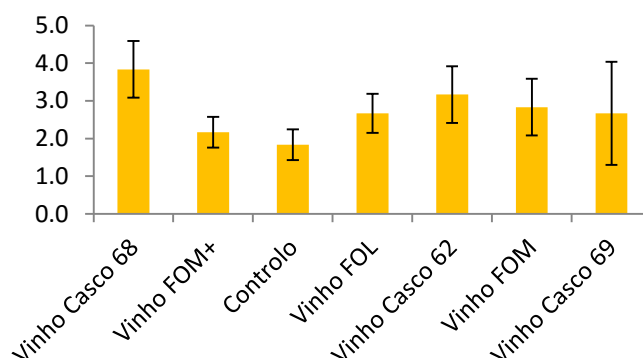


Figura 69 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação olfativa.

Quanto às características sensoriais a nível aromático, observar-se que o vinho estagiado em cascos é o preferido para a maioria dos provadores, facto este que se pode dever à maior quantidade de compostos voláteis da madeira que passam para o vinho, comparativamente com as aduelas. O casco 69 apresenta um desvio padrão muito elevado, uma vez que alguns dos provadores o classificam com notas boas e outros com notas más, assim sendo, verifica-se que para este vinho não há um consenso por parte dos provadores. O vinho controlo é o que apresenta uma menor classificação neste parâmetro, podendo este fator comprovar que as madeiras melhoram as características gustativas e organoléticas do vinho.

Na Figura 70, encontram-se representados os resultados obtidos pela prova sensorial, para o parâmetro da sensação gustativa.

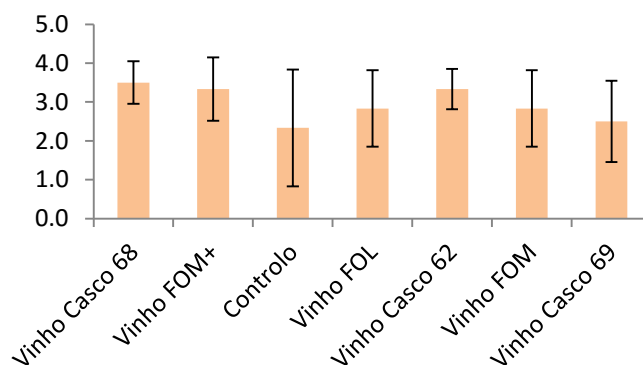


Figura 70 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação gustativa.

Pela observação dos resultados obtidos, verifica-se que os provadores continuam a ter preferência pelos vinhos estagiados nos cascos - 68 e 62. Contudo, nos vinhos estagiados em contato com as aduelas, o eleito pelos provadores foi o FOM⁺, uma vez que apresenta boas características na boca.

Os resultados obtidos pela prova sensorial, para o parâmetro da sensação gustativa, ao nível da sua adstringência, encontram-se representados na Figura 71.

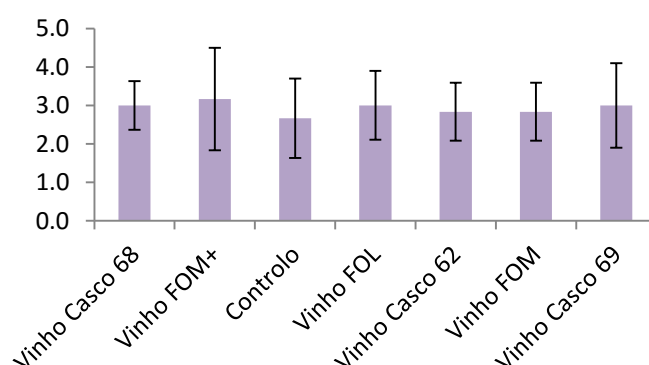


Figura 71 – Resultados obtidos pela prova sensorial para o parâmetro da sensação gustativa, ao nível da sua adstringência.

No sentido de complementar a informação da análise gustativa, foi pedido aos provadores que classifikassem os vinhos ao nível da sua adstringência. Como se pode verificar, os valores relativos aos resultados para este parâmetro, apresentam-se praticamente constantes para os diferentes vinhos estagiados quer em contato com as aduelas, quer em contato com os cascos. Contrariamente a este comportamento, verificamos que o vinho testemunha ou Controlo apresenta uma avaliação inferior feita pelos provadores, quanto ao nível da sua adstringência. Este facto pode dever-se à inexistência das reações entre os compostos do vinho e os compostos da madeira, que levam à formação de compostos estruturalmente mais complexos, consequentemente mais estáveis e que resultam numa perda de adstringência do vinho, obtendo vinhos mais suaves/ macios e arredondados.

Na Figura 72, encontra-se representada a classificação geral dos diferentes vinhos.

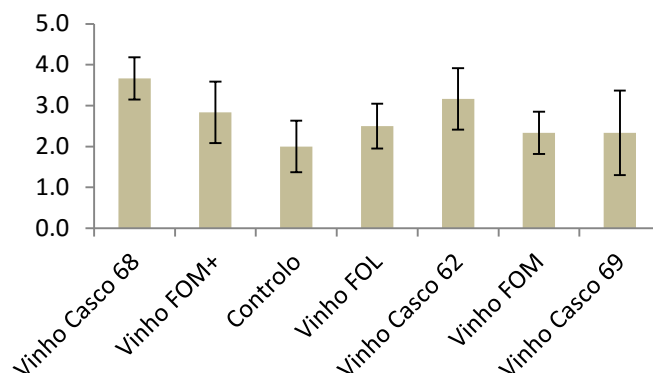


Figura 72 – Resultados obtidos para a classificação geral dos diferentes vinhos.

A classificação geral dos diferentes vinhos, para a análise sensorial, vai de encontro aos resultados encontrados nas análises físico-químicas, uma vez que os provadores mostram uma preferência significativa pelos vinhos envelhecidos nos cascos/barricas, comparativamente com os vinhos envelhecidos em contato com as diferentes aduelas. Tal como vimos nas análises físico-químicas os vinhos estagiados nos cascos eram os que apresentavam melhores resultados comparativamente com os vinhos em contato com as aduelas.

Em seguida, foi realizado um teste triangular com 9 séries diferentes, tendo sido pedido aos provadores que indicassem qual das amostras era diferente, e qual delas era a melhor.

Na Tabela 17, encontram-se representadas as amostras de vinho comparadas em cada série, e os seus resultados.

Tabela 17 – Amostras de vinho comparadas em cada série, e seus resultados.

Série	Amostra de vinho A	Amostra de vinho B	% de provadores que identificou o vinho diferente	% de provadores que prefere o vinho A
1	Vinho Casco 62	Vinho FOL	83	83
2	Vinho FOM ⁺	Controlo	100	83
3	Vinho FOL	Vinho FOM	17	83
4	Vinho FOL	Vinho Casco 69	100	67
5	Vinho FOM	Vinho FOM ⁺	83	33
6	Controlo	Vinho FOL	100	0
7	Vinho Casco 68	Vinho FOM ⁺	67	83
8	Vinho FOM ⁺	Vinho FOL	50	33
9	Vinho FOM	Controlo	33	83

Através dos resultados observados pela Tabela 17, verificou-se que os vinhos que se encontravam em cada série apresentavam características diferentes, uma vez que na maioria das séries mais de 50% dos provadores, não tiveram dúvidas em selecionar a amostra de vinho diferente. Verificou-se também existir um consenso quanto ao melhor vinho, uma vez que a percentagem dos vinhos eleitos é muito alta para a maioria das séries.

Conclusão

O presente trabalho, que teve como objetivo principal o estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro, foi realizado com o objetivo de perceber qual o tipo de queima de madeira que mais se adequaria a um vinho deste estilo; e de perceber qual a aproximação entre um mesmo vinho envelhecido em cascos ou envelhecido em contato com aduelas, ambos com o mesmo grau de queima.

Na primeira parte deste trabalho (Capítulo I), onde foi realizada a identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas aduelas de carvalho francês sujeitas a diferentes tratamentos térmicos, concluiu-se que todas as aduelas de madeira eram constituídas pelos mesmos compostos fenólicos, diferindo apenas nas concentrações de cada um deles, para cada uma das madeiras. Pode comprovar-se que os aldeídos que prevalecem em maiores concentrações nas três aparas de madeira são, os aldeídos cinâmicos – Coniferaldeído e Sinapaldeído; sendo que a madeira que apresenta um maior teor de aldeídos totais, é a aduela de queima média – C.O. FOM. Da análise da identificação dos principais compostos voláteis presentes na madeira, verifica-se que também aqui, os compostos encontrados para as diferentes aduelas com diferentes graus de queima, são os mesmos. Nesta parte do trabalho, realizou-se ainda uma análise das propriedades anti-oxidantes, onde se concluiu que, quer na avaliação da capacidade antiradicalar, quer na avaliação do poder redutor a aduela de madeira que apresentava valores mais elevados, era a de queima ligeira – C.O. FOL; facto este que pode estar relacionado com a estrutura dos compostos e com a presença de uma maior quantidade de ácidos fenólicos.

Na tentativa de perceber, de que forma estas diferentes características das aduelas de madeira com diferentes graus de queima, influenciavam as características polifenólicas do vinho de mesa tinto, foram realizadas várias análises físico-químicas; onde se realizaram ainda comparações entre estas e as análises do vinho envelhecido nos cascos/barricas de madeira, com os mesmos graus de queima.

Pela avaliação dos resultados obtidos para as várias análises das amostras de vinho em contato com as aduelas de diferentes queimas, concluiu-se que há um aumento de vários parâmetros após os 6 meses de estágio, nomeadamente do índice de fenóis totais, do teor de taninos proantocianínicos totais, do poder tanante e do índice de diálise, devendo-se este facto á formação de compostos estruturalmente mais complexos.

No que se refere aos parâmetros da cor, concluiu-se que houve um aumento significativo da intensidade corante até ao 4º mês de estágio, tendo-se observado de seguida uma estabilização da cor, na passagem para o 6º mês. Os vinhos estagiados nos cascos, apresentam uma menor intensidade corante e apresentam um maior valor médio de L^* (parâmetro do CIELab), que se traduz numa maior luminosidade e claridade. Concluiu-se ainda que, após os 6 meses de estágio, os vinhos que apresentavam uma notória diferença de cor quando comparados com o vinho controlo ao tempo zero, eram os vinhos envelhecidos em cascos, uma vez que os seus valores de ΔE eram muito superiores a 1. Quando comparados os teores de antocianinas livres totais e antocianinas monoglucósidas, presentes nas diversas amostras de vinho em contato com as aduelas de madeira, concluiu-se que há uma diminuição destas ao longo dos 6 meses de estágio, devido às inúmeras reações de condensação das antocianinas que ocorrem durante o processo evolutivo do vinho. Para além disso, concluiu-se ainda que os resultados obtidos na análise dos flavan-3-óis apresentavam a mesma tendência que os observados para as antocianinas, uma vez que aqui, a origem de compostos com um maior grau de polimerização não é visualizada através da análise por HPLC-DAD, podendo também ocorrer a precipitação destes mesmos compostos mais polimerizados.

De uma forma geral, concluiu-se que na maioria das análises não se observou diferenças estatisticamente significativas na influência do grau de tosta, nos diversos meses de análise. Contudo, pela comparação dos vinhos do casco 62 e do casco 69, que apresentam o mesmo grau de queima - ligeira, nas diversas análises, verifica-se que estes apresentam diferenças significativas, uma vez que o vinho que se encontra em estágio no casco 69 foi o que evoluiu mais rapidamente, pois apresenta uma menor concentração de antocianinas totais, uma menor intensidade corante, um menor índice de fenóis totais e um maior poder tanante. De facto, estes dois cascos apesar de serem do mesmo grau de tostagem foram adquiridos a empresas de tanoaria diferentes, Casco 62 – Seguin Moreau e o Casco 69 - Tonnellerie Baron.

Os resultados obtidos para a análise sensorial, vão de encontro aos resultados encontrados nas análises físico-químicas, uma vez que os provadores mostraram uma preferência significativa pelos vinhos envelhecidos nos cascos/barricas, comparativamente com os vinhos envelhecidos em contato com as diferentes aduelas. Assim sendo, de acordo com os resultados obtidos para as diversas análises, concluiu-se que de um modo geral o vinho estagiado nas barricas/cascos, é o mais apreciado comparativamente com as várias aduelas, e evolui mais rapidamente, uma vez que apresenta menor concentração de antocianinas totais e pigmentos totais, e maior grau de polimerização dos pigmentos.

Por fim, com este trabalho foi possível concluir que aos 2 meses de estágio é onde é mais notória a influência dos diferentes graus de queima, comparativamente com o vinho controlo, para a maioria das análises realizadas.

Estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro.

Bibliografia

Alañón, M.E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M.C.; Gordon, M.H.; Pérez-Coello, M.S. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chem.*, **2011**, *128*, 997–1002;

Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S. Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, *621*, 86-99;

Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 1410–1416;

Bakkalbasi, E., Mentes, Ö., Artik, N. Food ellagitannins-occurrence, effects of Processing and storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2009**, *49*, 283-298;

Bakker, J., Timberlake, C. F. Isolation, identification and characterization of new colour-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, *45*, 35–43;

Barbe, J.C.; Ferreira, A.C.S.; Bertrand, A. Dosage de dérivés furaniques et pyraniques issus du bois de chêne. *Journal des Sciences et Techniques de la Tonnellerie*, **1998**, *4*, 99-125;

Barquette, B., Trione, D. Les tanins. *Actas do 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, **1998**, *Vol II*, 255-261;

Bate-Smith, E.C. Leuco-anthocyanins I: Detection and identification of anthocyanins formed from leuco-anthocyanidins in plant tissues. *Biochemical Journal*, **1954**, *58*, 122-125;

Bate-Smith, E. C. Astringency in foods. *Food*, **1954a**, *23*, 124;

Bate-Smith, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 907-912;

Bautista-Ortín, A.B., Lencina, A.G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless

steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2008**, 14, 63-70;

Beart J., Lilley T., Haslam E. Plant polyphenols secondary metabolism and chemical defense: some observations. *Phytochemistry*, **1985**, 24, 33-38;

Benzie, I., Strain, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **1996**, 139, 70-76;

Biermann C. S., Mc Ginnis G., Schultz T. P. Scanning electron microscopy of mixed hardwoods subjected to various pretreatment processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1987**, 35, 713-716;

Billot, J. Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation de la Poire Passe-Crassane. *Physiol. Veg.*, **1983**, 21, 527-535;

Bindron, J.N.; Chatonnet, P.; Pons, M. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1988**, 22, 275-294;

Block, G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.*, **1992**, 50, 207-213;

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 4505–4515;

Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **1997**, 30, 609-615;

Boulton, R. The co-pigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**, 52, 67-87;

Bourgois J., Guyonnet R. Characterization and analysis of torrefied wood. *Wood Sci. Technol.*, **1988**, 22, 143-155;

Brouillard, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 1311-1323;

Brouillard, R., Lang, J. The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvidin, a natural anthocyanin. *Canad. J. Chem.*, **1990**, 68, 755-761;

Cabrita, M.J.B., Garcia, R., Martins, N., Silva, M.D.R., Freitas, A.M.C. Gas Chromatography in the Analysis of Compounds Released from Wood into Wine. *Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, **2012**, 10, 186-208;

Canas, S., Casanova, V., & Belchior, A.P. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2008**, 21, 626-633;

Canas, S., Caldeira, I., & Belchior, P. A. Comparação de sistemas alternativos para o envelhecimento de aguardente vínica. Efeito da oxigenação e da forma da madeira. *Ciência Tec. Vitiv.*, **2009a**, 24, 33-40;

Canas, S. Estudo dos compostos extraíveis da Madeira (carvalho e castanheiro) e dos processos de extracção na perspectiva do envelhecimento em enologia. *Dissertação de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa*, **2003**;

Canas S., Belchior A.P., Spranger M. I., Bruno de Sousa R. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 496- 502;

Cardoso, A. D. O vinho da uva à garrafa. Âncora Editora, Novembro 2007;

Cassidy, A., B. Hanley, et al. "Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health". *J Sci Food Agric*, **2000**, 80, 7, 1044- 1062;

Cérdan T. G., Ancín-azpilicueta C. Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization. *LWT*, **2006**, 39, 199-205;

Chatonnet, P.; Boidron, J. N. Dosage de composés volatils issus du bois de chêne par chromatographie en phase gazeuse: Application à l'étude de l'élevage des vins en fûts de chêne. In *Actualités oenologiques 89: Comptes Rendu du IV Symposium International d'Oenologie*, Bordeaux, **1989**;

Ribereau-Gayon, P. et Lonvaud Aline, Eds.; Dunod: Paris, **1990**, 477-481;

Chatonnet, P. Les composés aromatiques du bois de chênes cédés aux vins. *Vigne et vin publ. Intern.*, **1992**, 81-91;

Chatonnet, P., Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. Maitrise de la chauffe de brûlage en tonnellerie. Application à la vinification et à l'élevage des vin en barriques. *Rev. Fr. Oenol.*, **1993**, *144*, 41-53;

Chatonnet, P. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. *Thèse doctorat de l'Université de Bordeaux II*, France, **1995**, 268;

Chatonnet, P.; Boidron, J.N.; Pons, M. Effect of heat on oak wood and its chemical composition. Part 2. Variations of certain compounds in related to toasting intensity. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1989**, *23*, 223-250;

Chen, C.L. Constituants of *Quercus alba*. *Phytochemistry*, **1970**, *9*, 1149;

Chira, K., Teissedre, P. Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, **2013**, *140*, 168-177;

Chira, K., Teissedre, P. Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel: effect of oak species involved and toasting process. *Eur Food Res Technol*, **2015**, *240*, 533-547;

Clifford, A. J.; Ebeler, S. E.; Ebeler, J. D.; Billis, N. D.; Hinrichs, S. H.; Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *AmJ. Clin. Nutr.*, **1996**, *64*, 748–756;

Czochanska, Z., Foo, L. Y., Porter, L. J. Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 1819-1822;

Dallas, C., Laureano, O. Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young Portuguese red table wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1994**, *65*, 477-485;

Dallas, C., Ricardo da Silva, J. M., Laureano, O. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis*, **1995**, *34*, 51–56;

Dallas, C., Da Silva, R., Laureano, O. Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996a**, *70*, 493-500;

Darné, G. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. PhD Thesis. *University of Bordeaux I, France*, **1991**;

Davies, A., Mazza, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993**, 41, 716-720;

De Freitas, V. A. P. Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse Université de Bourdeaux II, France*, **1995**;

De Freitas, V. A. P., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, **1998**, 49, 1435-1441;

De Freitas, V. A. P., Ramalho, P. S., Azevedo, Z., Macedo, A. Identification of some volatile descriptors of the rock-rose-like aroma of fortified red wines from Douro demarcated region. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 4327-4331;

De Freitas, V. A. P., Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(2), 940-945;

De Freitas, V.; Sousa, C.; Silva, A. M. S.; Santos-Buelga, C.; Mateus, N. Synthesis of a new catechin-pyrylium derived pigment *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9349– 9352;

Dubois, P. Apport du fût de chêne neuf à l'arôme des vins. *Revue Française de Oenologie*, **1989**, 120, 19-24;

Es-Safi, N., Cheynier, V., Moutounet, M. Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002a**, 50, 5571-5585;

Fengel, D. e Wegner, G. Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. *Walter de Gruyter (Ed.)*, Berlin, **1989**, 612;

Fernández de Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M. Volatile compounds and sensorial characterization of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, **2014**, 147, 346–356;

Feuillat, F., Keller, R. Variability of oak wood (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl.). Anatomy relating to cask proprieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1997**, *48*, 502-508;

Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, *45*, 2262-2266;

Francis, F.J. Food Colorants:Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1989**, *28*, 273-280;

Freitas, L., Rodrigues, J., & Graças, J. Composição dos extractivos da madeira de pinheiro bravo: variação borne/cerne e lenho normal/lenho resinado. 5º Congresso Florestal Nacional, 16 a 19 Maio. *Actas Instituto de Investigação Científica Tropical*, Viseu, **2005**, T4-31, 3;

Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P. J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Bonvin, J. F. Sctructure of new anthocyanins-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkins Trans.*, **1996**, *1*, 735-739;

García-Carpintero, E.G., Gallego, M.A.G., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, M.A. Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry*, **2012**, *134*, 851-863;

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Food Science & Technology*, **2006**, *17*, 438-447;

Gaulejac, NSC., Vivas, N., de Freitas, V., Bourgeoi, G. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, *79*, 1081-1090;

Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. PhD Thesis. Université de Bordeaux II, France, **1978** ;

Guerra, C. C. Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interpretation chimique de la couleur des vins rouges. *Thèse de Doctorat*, **1997**;

Guchu, E., Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., González-Viñas, M.A., Ibáñez, M.D.C. Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry*, **2006**, 99, 350-359;

Guymon J. F., Crowell E. A. Separations of vanillin, syringaldehyde and other aromatic compounds in the extracts of French and American oak woods by brandy and aqueous alcohol solutions. *Qual. Plant. Materiae*, **1968**, 16, 302-333;

Hale, M. D.; McCafferty, K.; Larmie, E.; Newton, J.; Swan, J. S. The influence of oak seasoning and toasting parameters on the composition and quality of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 495-502;

Haluk, J. P., & Irmouli, M. The fixed polymer constituents in cooperage oak: cellulose, hemicelluloses and lignin. *J. Sci.Tech. Tonnellerie*, **1997**, 4, 43-82.

Hart, J. H. Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1981**, 19, 437–458;

Haslam, E. *In vino veritas*: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 2577-2582;

Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, **1996**, 5, 205-215;

Haslam, E., Lilley, T. Natural astringency in foodstuffs: A molecular interpretation. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1988**, 27, 1-41;

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 572–584;

Heredia, F., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J., Vicario, I., Santos.Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry*, **1998**, 63, 491-498;

Hodge J. E. Origin of flavour in foods. Nonenzymic browning reactions. *In: Chemistry and Physics of flavou* , Schultz H. W., Day E. A., Libey L. M. (Eds.), AVI Publis. Co, Westport., **1967**, 465-491;

Jeandet, P.; Bessis, R.; Gautheron, B. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1991**, 42, 41-46;

Jordão, A. Interacção entre os compostos fenólicos do vinho tinto e os compostos extraídos da madeira durante o envelhecimento. *Dissertação de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa*, **2005a**;

Jurd, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the ageing of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1969**, 20, 191-195;

Keller, R. Différentes variétés de chênes et leur répartition dans le monde. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1978**, 21, 191-229;

Kleinschmit J. Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Ann.Sci. For.*, **1993**, 50, 166-185;

Korhammer, S.; Reniero, F.; Mattivi, F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry*, **1995**, 38, 1501–1504;

Lee, C., Jaworski, A. Major phenolic compounds in ripening white grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1989**, 41, 1, 87-89;

Lee, C., Jaworski, A. Identification of some phenolics in White grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**, 1, 43-46;

Longcake, P.; Pryce, R. J. Oxidative dimerization of 4-hydroxystilbenes in vitro: production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1977**, 208-210;

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Re´me´s, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81, 230-242;

Masson, G., Moutounet, M., Puech, J. L. Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1995**, 46, 262-268;

Masson, G., Puech, J., Moutounet, M. Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bulletin OIV*, **1996**, 785-786, 634-657;

Mateus, N., Proença, S., Ribeiro, P., Machado, J. M., De Freitas, V. A. P. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinífera* varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, **2001c**, 3(2), 102-110;

Mateus, N., Silva, A. M. S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., de Freitas, V. A. P. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 2110–2116;

Matricardi, L.; Waterhouse, A. L. Influence of toasting technique on color and ellagitannins of oak wood in barrel making. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 519-525;

Michael, N. C. "Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**, 79, 3, 362-372;

Michaud, J., Lacaze, P., Masquelier, J. Fractionnement des oligomeres flavanoliques du raisin. *Bull. Soc. Pham.* **1971**, 110, 111-116 ;

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, **2000**, 52, 673–751;

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva, J. M. Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003b**, 51, 6475-6481;

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. Evolution of phenolic content of red wines from *Vitis vinífera* L. ageing in bottle. *Food Chemistry*, **2005**, 95, 405-412;

Monties B. Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin*, **1987**, 22, 169-190;

Monties, B. Composition des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin*, **1987b**, 21, 169-190;

Mosedale, J.R.; Puech, J.L.; Feuillat, F. The influence on wine flavor of the oak species and natural variation of heartwood components. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 503-512;

Moutounet, M., Rigaud, J., Souquet J., Cheynier, V. Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin. Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne. *Bull. de O.I.V.*, **1996**, 738-784, 433-443;

Moutounet, M.; Puech, J. L.; Keller, R.; Feuillat, F. Les caractéristiques du bois de chêne en relation avec son utilisation en oenologie: Le phénomène de duramisation et ses conséquences. *Rev. Fr. Oenol.*, **1999**, 174, 12-17;

Nishimura K., Ohnishi M., Masahiro M., Kunimasa K., Ryuichi M. Reactions of wood components during maturation. In: Flavour of distilled beverages: origin and development. Piggott, J. R. (Ed.), Ellis Horwood Limited, Chichester, **1983**, 241-255;

Nondedeu L., Leaute R., Grandchamp B., Bonnichon C., Laurichesse D., Trichet P.. Brûlage des barriques de chêne et qualité des vins de Médoc. *Prog. Agric. Vit.*, **1988**, 105, 505-514;

Nykänen, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1986**, 37, 84-96;

Oliveira, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A. M. S.; de Freitas, V.; Mateus, N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. *Anal. Clin. Chim. Acta*, **2006**, 563, 2-9;

Pearl I. A., Beyer D. L., Johnson B., Wilkison S. Alkaline hydrolysis of representative hardwoods. *TAPPI*, **1957**, 40, 374-378;

Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Cano-Mozo, E., González-Sanjosé, M.A. The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2009**, 22, 204-211;

Petruzzi, L., Bevilacqua, A., Ciccarone, C., Gambacorta, G., Irlante, G., Lamacchia, C., Sinigaglia, M. Artificial aging of Uva di Troia and Primitivo wines using oak chips inoculated with *Penicillium purpurogenum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2012**, 92, 343-350;

Piretti, M., Ghedini, M., Serrazanetti, P. Isolation and identification of polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera*. *Annal. Chem.*, **1976**, 66, 429-437;

Pissarra, J.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science*, **2003**, 68, 476-481;

Pissarra, J., Lourenço, S., González-Paramás, A., Mateus, N., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. *Anal. Chim. Acta*, **2004a**, 513, 215-221;

Porter, L. J. Flavans and proanthocyanidins. In: *The Flavonoids: Recent advances since 1980*. Ed. Harborne, J. B., Chapman & Hall, London, **1988**;

Porter, L. J. Tannins. In J. B. Harborne (Ed.), *Plant phenolics. Methods in plant biochemistry*, London: Academic Press, **1989**, 1, 389–419;

Pratt, D.E. Phenolic Compounds in Food and Their Effects On Health, *American Chemical Society*, Washington DC, **1992**;

Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. Oligomeric and Polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 781-784;

Puech J. L., Maga J. Influence du brûlage du fût sur la composition des substances volatiles et non volatiles d'une eau-de-vie. *Revue des Œnologues*, **1993**, 12, 13-16;

Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, **2001**, 90, 494–507;

Ribéreau-Gayon, P. Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les Flavonosides et les anthocyanosides. *Ann. Physiol. Veg.*, **1964**, 6, 211-242;

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, **1966**, 2, 627-631;

Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques totaux des végétaux. *Dunod*, Paris, **1968**, 254;

Ribichaud, J. L., Noble, A. C. Astringency and bitterness of selected phenolic in wines, *J. Sci. Food Agric.*, **1990**, 53, 343–353;

Ricardo de Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J., Moutounet, M., Cabanis, J., Bourzeix, M. Interaction of grape seed procyanidins with various protein in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1991a**, 57, 11-125;

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 20, 933-956;

Rice-Evans, C., Packer, L. Flavonoids in Health and Disease, *Marcel-Dekker*, New York, **1998**;

Rivas-Gonzalo, J. C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43, 1444-1449;

Rodríguez Bencomo, J, J., Ortega Heras, M., Pérez Magarín, S., González Huerta, C., González San José, M, L. Importance of chip selection and elaboration process on the aromatic composition of finished wines, *J. Agric. Food Chem*, **2008**, 56, 5102-5111;

Romero, C., Bakker, J. Interaction between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanins composition and color in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3130-3139;

Romero, C., Bakker, J. Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. *Int. J. Food Sci. Techn.*, **2000**, 35, 129-140;

Salagoity-Auguste, M., Bertrand, A. Wine phenolics – analysis of low molecular weight components by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1984**, 35, 1241-7;

Samman, S., Lyons Wall, P. M., & Cook, N. C. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In C. A. Rice- Evans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease*, New York: Marcel Dekker, **1998**, 469-482;

Sanza, M.D.A., Domínguez, I.N. Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods. Anthocyanin composition. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 563, 255-263;

Sarni F., Moutounet M., Puech J.-L., Rabier Ph. Effect of heat treatment of oak wood extractable compounds. *Holzforschung*, **1990a**, 44, 461-466;

Sarni F., Rabier Ph., Moutounet M. Fabrication des barriques et thermotraitement: relevé des températures. *R. F. Oenol.*, **1990b**, 123, 53-58;

Sarni F., Moutounet M., Puech J.-L. Composés phénoliques extractibles de copeaux de bois de chêne. *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*, Paris, **1991**, 231-239;

Schwarz, M., Wabnitz, T. C., Winterhalter, P. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 3682-3687;

Seikel, M. K.; Hostettler, F. D.; Niemann, G. J. Phenolics of *Quercus robur* wood. *Phytochemistry*, **1971**, 10, 2249-2251;

Severo, E. T., Calonego, F. W., & Sansígolo, C. A. Composição química da madeira de *Eucalyptus citriodora* em função das direcções estruturais. *Silva Lusitana*, **2006**, 14, 1, 113-126;

Singleton, V., Rossi, A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1965**, 16, 144-158;

Singleton, V. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: Observations and practical implications, *American Journal of Enology and Viticulture*, **1987**, 38, 69-77;

Soares, S., Mateus, N. e De Freitas, V. "Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 16, 6726-6735;

Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, **1971**, 10, 2175-2216;

Somers, T. C., Evans, M. E. Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, **1986**, 25, 31-39;

Sommers, T. C., Evans, M. E. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". *J. Sci. Food Agric.*, **1976**, 28, 279-287;

Sousa, C.; Mateus, N.; Perez-Alonso, J.; Santos-Buelga, C.; Freitas, V. Preliminary study of oaklins, a new class of brick-red catechinpyrylium pigments resulting from the reaction between catechin and wood aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9249-9256;

Spillman, P. J., Pollnitz, A. P., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K., & Sefton, M. A. Accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red, and model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 2584-2589;

Stintzing, F.C.; Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, **2004**, 15, 19-38;

Teixeira, N., Azevedo, J., Mateus, N., De Freitas, V. Proanthocyanidin screening by LC–ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. *Food Chemistry*, **2016**, 190, 300-307;

Thompson, R., Jacques, D., Haslam, E., Tanner, R. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant proanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **1972**, 1387-1399;

Timberlake, C., Bridle, P. Spectral studies of anthocyanins and anthocyanidin equilibrium in aqueous solution. *Nature*, **1966**, 212, 158-162;

Timberlake, C., Bridle, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1976b**, 27, 97-105;

Vivas, N.; Glories, G.; Bourgeois, G.; Vitry, C. Les ellagitannins de bois de Coeur de diferentes espèces de chênes (*Quercus* sp.) et de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.). Dosage dans les vins rouges élevés en barriques. *Journal des Sciences de la Tonnellerie*, **1996**, 2, 25-49;

Vivas N. Apports récents à la connaissance du chêne de tonnellerie et à l'élevage des vins rouges en barrique. *Bull. OIV*, **2000b**, 827-828, 79-108;

Vivas, N. Manuel de tonnellerie - à l'usage des utilisateurs des fûts. *Éditions Féret*, Bordeaux, France, **2002**, 207;

Weinges, K., Kaltenhauser, W., Marx, H., Nader, E., Nader, F., Perner, J., Seler, D. Procyanidine aus fruchten. *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 711, 184-204;

Zoecklein, B., Fugelsang, C., Gump, B., Nury, S. Wine analysis and production. *The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing* **1995**.

Anexos

ANEXO 1



Ficha de Prova

Classifique os vinhos de A a G, numa escala de 1 a 5.

1 - Muito mau; 2- Mau; 3- Razoável; 4- Bom; 5- Muito Bom

1 - A cor deste vinho é atrativa para si?
A -
B -
C -
D -
E -
F -
G -

3 - Gosta deste vinho na boca?
A -
B -
C -
D -
E -
F -
G -

5 - No geral, como classifica este vinho?
A -
B -
C -
D -
E -
F -
G -

2 - Gosta deste vinho a nível aromático?
A -
B -
C -
D -
E -
F -
G -

4 - Como o classifica este vinho ao nível da sua adstringência?
A -
B -
C -
D -
E -
F -
G -

ANEXO 2



Teste triangular

Vinhos de mesa

Indique qual o vinho diferente:

	A	B	C	Qual o melhor ?
Série 1				
Série 2				
Série 3				
Série 4				
Série 5				
Série 6				
Série 7				
Série 8				
Série 9				

