



8º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO

8th ALENTEJO VINE AND WINE SYMPOSIUM

Organizado por / Organizers:

ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

CVRA – Comissão Vitivinícola Regional Alentejana

CCDRA – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento da Região Alentejo

DRAP AL – Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

UE – Universidade de Évora

Com o apoio de / Supporting Team:



Iniciativa enquadrada no Evento Alentejo das Gastronómias Mediterrânicas – Festival Internacional

Co-Financiamento:



ACTAS

Comissão Executiva / Organizers:

ATEVA – Francisco Mata

CVRA – Dora Simões

CCDRA – Francisco Sabino

DRAP AL – Teresa Engana

UE – João Mota Barroso

Conselho Científico / Technical Committee:

Engenheira Miriam Cavaco - Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

Doutora Alice Leitão – Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

Professora Helena Oliveira – Instituto Superior de Agronomia

Professor António Mexia - Instituto Superior de Agronomia

Doutor António Sérgio Curvelo Garcia – Estação Vitivinícola Nacional

Professora Olga Laureano - Instituto Superior de Agronomia

Professor Doutor Jorge Ricardo Silva - Instituto Superior de Agronomia

Professor Antero Martins - Instituto Superior de Agronomia

Doutor José Eduardo Jorge Eiras-Dias - Estação Vitivinícola Nacional

Engenheira Lurdes Rocha – Estação Agronómica Nacional

Professor Rogério Albino Neves de castro - Instituto Superior de Agronomia

Professor João Manuel Mota Barroso – Universidade de Évora

Professora Raquel Ventura - Universidade de Évora

Professor Doutor Timothy Hogg – Viniportugal

SESSÃO I / SESSION I

Sessão de Abertura Presidida por Sua Ex^a o Secretário de Estado das Pescas e Agricultura – Dr. Luís Medeiros Vieira / Opening Session Chaired by his Excellence the Secretary of State for Fisheries and Agriculture - Dr. Luís Medeiros Vieira



Alocações de Boas Vindas e de Introdução ao Simpósio pelas Entidades Organizadoras / Organizers' welcome speeches and introduction to the symposium.

Dr. João Cordovil – Presidente da Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Alentejo

Professor Carlos Braumann – Reitor da Universidade de Évora

Dr^a Dora Simões – Presidente da Direcção da Comissão Vitivinícola Regional Alentejana

SESSÃO II / SESSION II

Material Vegetal / Plant Material

Presidente da sessão / Session president – José Eiras Dias (EVN Dois Portos)

Secretário / Secretary – António Rosa (ATEVA Évora)

CONFERÊNCIA I / CONFERENCE I

Doenças do Lenho / Grapevine Trunk Diseases

Moderadora / Moderator – Helena Oliveira (ISA Lisboa)

Oradores / Speakers – Cecília Rego, Jorge Sofia, José Freitas, Rui Delgado

SESSÃO III / SESSION III

Enologia I / Oenology I

Presidente da sessão / Session president – António Curvelo Garcia (EVN Dois Portos)

Secretário / Secretary – Maria João Cabrita (EU Évora)

SESSÃO IV / SESSION IV

Enologia II / Oenology II

Presidente da sessão / Session president – Olga Laureano (ISA Lisboa)

Secretário / Secretary – Pedro Baptista (FEA Évora)

CONFERÊNCIA II / CONFERENCE II

Produção Enológica e Marketing / Oenological Production and Wine Marketing

Moderadora / Moderator – Francisco Borba (Viniportugal)

Oradores / Speakers – Christophe Gerland e Brian Howard





SESSÃO V / SESSION V

Tecnologia da Vinha I / Vineyard Technology I

Presidente da sessão / Session president – Rogério de Castro (ISA Lisboa)

Secretário / Secretary – Francisco Mata (ATEVA Évora)

SESSÃO VI / SESSION VI

Tecnologia da Vinha II / Vineyard Technology II

Presidente da sessão / Session president – João Mota Barroso

Secretário / Secretary – João Maria Correia (ATEVA Évora)

CONFERÊNCIA III / CONFERENCE III

Sustentabilidade I / Sustainability I

Moderadora / Moderator – João Mota Barroso (UE Évora)

Oradores / Speakers – J. Ramon Lissarague

SESSÃO VII / SESSION VII

Discussão de Posters / Posters Discussion

SESSÃO VIII / SESSION VIII

Internacionalização e Marketing / Internationalization and Marketing

Presidente da sessão / Session president – Maria Raquel Lucas (EU Évora)

Secretário / Secretary – Sónia Vieira (I&D Viniportugal)

CONFERÊNCIA IV / CONFERENCE IV

Sustentabilidade II / Sustainability II

Moderadora / Moderator – Dora Simões (CVRA Évora)

Oradores / Speakers – Joel Rochard; Lisa Francioni; Timothy Hogg

SESSÃO DE ENCERRAMENTO / CLOSING SESSION

Presidida por Sua Ex^a o Sr. Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas – Dr. António Serrano / Chaired by his excellence the Minister of Agriculture- Dr. António Serrano





Alocações de encerramento / Organizers' closing speeches

Dr. João Libório – Director Regional de Agricultura do Alentejo

Dr. Afonso Correia – Presidente do Instituto da Vinha e do Vinho

Prof. Arlindo Maria Ruivo – Presidente da Direcção da Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo





ÍNDICE

| | |
|--|----|
| <p>Elsa GONÇALVES; Antero MARTINS; L.C. CARNEIRO; Maria Clara ROQUE-VALE; Maria Alice PRATES; Filipe PERDIZ; Carlos FIALHO; Joaquim CORREIA</p> <p>AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRAVARIETAL DAS CASTAS VIA DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS PARCIALMENTE REPETIDOS</p> | 7 |
| <p>Teresa MOTA; Joana MENEZES; João GARRIDO; Mário CUNHA e Jorge QUEIROZ</p> <p>EFEITO DA APLICAÇÃO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO ‘PROHEXADIONA DE CÁLCIO’ (REGALIS®) NA CASTA ALVARINHO (V. VINIFERA L.) NA REGIÃO DOS VINHOS VERDES</p> | 17 |
| <p>C. ARRANZ, J. YUSTE, J. ORTIZ, J.P. MARTÍN; J.A. RUBIO</p> <p>CASTAS PRESENTES NO OESTE DE CASTILLA E LEON (ESPAÑA) E NORTE DE PORTUGAL</p> | 29 |
| <p>Jorge CUNHA; Margarida TEIXEIRA-SANTOS; Pedro FEVEREIRO; José Eduardo EIRAS-DIAS</p> <p>A RIQUEZA DESCONHECIDA DAS POPULAÇÕES DE VINHA SELVAGEM (VITIS VINIFERA L. SUBSP. SYLVESTRIS) DO ALENTEJO</p> | 41 |
| <p>Tatiana BUHNER ZAHARIEVA, Rosa GIMÉNEZ, Ernesto FRANCO, Raquel MENÉ, Javier ANDREU, Ramón NÚÑEZ, Vicente FERREIRA, Yolanda GOGORCENA</p> <p>AROMAS ESPECÍFICOS EM VINHOS DE VARIEDADES DE VIDEIRAS ESPANHOLAS ANTIGAS CONSERVADAS EM BANCOS DE GERMOPLASMA</p> | 53 |
| <p>Filomena L. DUARTE; Geni C. ZANOL; M. Filomena ALEMÃO; Ana S. GOMES; Ricardo REIZINHO; Andreia TEIXEIRA; Ana C. COSTA; Paulo T. RAMOS M. Margarida BALEIRAS-COUTO</p> <p>IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE ENOLÓGICO POR PERFIS DE RESTRIÇÃO DE RDNA</p> | 63 |
| <p>E. VIEIRA; J. DRUMONDE-NEVES; R. MACHADO; P. SILVA; A.C. GOMES; S. SOUSA; P.T. RAMOS; F. ALEMÃO; M.T. LIMA, I. ARAÚJO; F.L. DUARTE; M.A. SANTOS; M. CASAL; D. SCHULLER</p> <p>A COLECCÃO DE ESTIRPES AUTÓCTONES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DAS PRINCIPAIS REGIÕES VITIVINÍCOLAS PORTUGUESAS</p> | 71 |

| | |
|--|-----|
| Sara CANAS; Ilda CALDEIRA; A. P. BELCHIOR COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE ENVELHECIMENTO DE AGUARDENTE VÍNICA | 81 |
| Geni C. ZANOL; João BRAZÃO; Pedro CLÍMACO; Paula MARTINS-LOPES; M. Margarida BALEIRAS-COUTO; Henrique P. GUEDES-PINTO; José E. EIRAS-DIAS OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CASTAS PRESENTES EM MOSTOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES NUCLEARES | 91 |
| Maria João CABRITA; Helena ROQUE; Raquel GARCIA; Cristina BARROCAS DIAS ACIDOS FENÓLICOS, ALDEÍDOS FENÓLICOS E DERIVADOS FURÂNICOS EM APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO FRANCÊS E AMERICANO | 101 |
| António M. JORDÃO; Sylvie SIMÕES ; Fernando J. GONÇALVES ; Ana C. CORREIA ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ALGUMAS CASTAS TINTAS DA REGIÃO DO DÃO E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO FENÓLICA | 111 |
| Maria P. SERRATOSA; Ana MARQUEZ; Azahara LOPEZ-TOLEDANO; Julieta MERIDA; Manuel MEDINA COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS DE UVAS SECAS EM CÂMARA COM TEMPERATURA CONTROLADA DA CASTA PEDRO XIMÉNEZ | 123 |
| María de las Nieves LÓPEZ DE LERMA; Jose PEINADO; Juan J. MORENO; Rafael A. PEINADO ENVELHECIMENTO ACELERADO DOS VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ | 133 |
| Paula FERNANDEZ; Amândio CRUZ; Catarina VIEIRA; Joana de CASTRO; Diogo LOPES; Carlos LUCAS; Fernando RIBEIRO; Jorge RICARDO-DA-SILVA; Rogério de CASTRO COMPORTAMENTO AGRONÓMICO E ENOLÓGICO DAS CASTAS SYRAH E TOURIGA NACIONAL EM SEIS “TERROIRS” DE PORTUGAL | 143 |
| Barroso, João M.; Vaz Freire, J.L.; Vaz Freire, M. INFLUÊNCIA DO ENRELVAMENTO NO COMPORTAMENTO AGRONÓMICO E ENOLÓGICO DA CASTA ‘TRINCADEIRA’ NO ALENTEJO | 155 |
| Rogério de CASTRO; Aurélio CLARO; Ana RODRIGUES; António TEIXEIRA; José MACHADO; Chiara PIOVENE; Amândio CRUZ PODA MECÂNICA NA VINHA - EFEITOS NO RENDIMENTO E NA QUALIDADE | 167 |
| Anabela ANDRADE; Amândio CRUZ; M. António BATISTA; A. DIAS-CARDOSO; Rogério de CASTRO CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS E ENOLÓGICAS DA CASTA BAGA, EM DIFERENTES SISTEMAS DE CONDUÇÃO | 177 |

| | |
|---|-----|
| Carlos COSTA-RODRIGUES ; Amândio CRUZ ; Manuel BOTELHO; Carlos RODRIGUES ; Rogério de CASTRO ESTRATÉGIAS DE GESTÃO DO COBERTO VEGETAL E DA PRODUÇÃO NA CASTA TOURIGA-NACIONAL NA REGIÃO DO DÃO | 187 |
| <i>António Dias - Syngenta</i> PERGADO® F – À PROVA DE MÍDIO | 197 |
| M ^ª V. ALBURQUERQUE; J. YUSTE INFLUÊNCIA DA DOTAÇÃO DE REGA NO TEOR DE ÁGUA DO SOLO, NO ESTADO HÍDRICO E NA PRODUTIVIDADE DE UMA VINHA DE TEMPRANILLO, NO VALE DO RIO DOURO (ESPANHA) | 199 |
| <u>Jorge QUEIROZ</u> ; Mário CUNHA; António FONSECA; Mafalda MACHADO; Luísa BORGES; Rogério de CASTRO; Mário de SOUSA; António MAGALHÃES; David GUIMARAENS VITICULTURA EM FORTE DECLIVE E CONDUÇÃO DE VIDEIRAS EM PATAMARES ESTREITOS NA REGIÃO DO DOURO – 4 ANOS DE RESULTADOS | 209 |
| Pedro AMARO O ENXOFRE É O PESTICIDA COM MAIOR CONSUMO EM PORTUGAL E NA VINHA | 221 |
| João VILA-MAIOR; Jorge VIÇOSO; António VILLALOBOS PROFILER®: UM NOVO E INOVADOR FUNGICIDA SISTÉMICO CONTRA MÍDIO DA VIDEIRA (PLASMOPARA VITICOLA) (Berk.et Curt.) Berl. et De Toni | 233 |
| Carla VIVAS; António SOUSA INTERNACIONALIZAÇÃO DAS EMPRESAS DO SECTOR VITIVINÍCOLA PORTUGUÊS: UMA METODOLOGIA DE ABORDAGEM ESTRATÉGICA | 243 |
| GIOVANNI CARGNELLO “<u>GREAT CHAIN</u>”: “<u>GREAT QUALITY</u>” - “<u>GREAT ETHICA</u>” OR “<u>META-ETHICAL GREAT</u>” - “<u>META-ETHICAL VITICULTURE GREAT</u>” OR “<u>META-ETHICAL VITICULTURE</u>” OR “<u>GREAT VITICULTURE</u>”. URGENT NECESSITY TO GO FURTHER TO OR BEYOND THE TECHNICAL, ECONOMICAL AND LANDSCAPE QUALITY PROFIT FOCUSING ON THE “<u>META-ETHICAL VITICULTURE (GREAT)</u>” OR “<u>GREAT VITICULTURE</u>”. RESEARCH AND VARIOUS CONSIDERATIONS. | 253 |
| Mário CRAVIDÃO; Duarte XARA BRASIL A IMPORTÂNCIA DA MARCA PORTUGAL E DA MARCA REGIÃO DE VINHOS NA INTERNACIONALIZAÇÃO DE UM PRODUTOR | 269 |

| | |
|--|------------|
| José A. REGODÓN; Emile BELTRAND; Emiliano ZAMORA; M ^a Luz ÁLVAREZ y Manuel RAMIREZ | |
| EFFECTO DE LA CANTIDAD DE INÓCULO DE LEVADURAS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ORGANOLÉPTICAS DEL VINO | 279 |
| Ilda ABREU; Ricardo PINTO; Paulo COSTA; Geni C. ZANOL & José EIRAS-DIAS | |
| OCORRÊNCIA DE FLORES ATÍPICAS NA CV. ARAGONEZ (<i>Vitis vinifera</i> L.) | 289 |
| Ricardo ANDRADE, Luís C. CARNEIRO, Amândio CRUZ, Pedro CLÍMACO, Rogério de CASTRO | |
| AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRONÓMICO DE CLONES DA CASTA ARAGONEZ E SUA CARACTERIZAÇÃO AMPELOMÉTRICA | 299 |
| João CASTRO PINTO | |
| ESTUDO DA EFICÁCIA DE UM BIOFERTILIZANTE À BASE DE QUITOSANA NO CONTROLO DE DOENÇAS DO LENHO DA VIDEIRA | 311 |
| Filomena L. DUARTE *, Alberto LÓPEZ ¹ , M. Filomena ALEMÃO ¹ , Rodrigo SANTOS , Sara CANAS ¹ | |
| EFICÁCIA DE DIFERENTES DESINFECTANTES EM CONDIÇÕES DE ADEGA | 319 |
| J. R. MARQUES DA SILVA; PAULO MESQUITA; ADÉLIA SOUSA; L. L. SILVA; JOÃO M. R. SERRANO; FÁTIMA BAPTISTA | |
| INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO AR NA VARIABILIDADE ESPACIAL E TEMPORAL DA MATURACÃO DE UVA PARA VINHO -VARIEDADES: ARAGONÊS, TRINCADEIRA- | 325 |
| Goreti BOTELHO; Maria Cristina CLÍMACO | |
| A CROMATOGRAFIA GASOSA-OLFACTOMETRIA NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EM VINHOS | 349 |
| Hélia CARDOSO; Aladje BALDÉ; Andreia FIGUEIREDO; Augusto PEIXE e Maria S. PAIS | |
| OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CASTAS DE <i>VITIS VINIFERA</i> L. MEDIADA POR <i>A. TUMEFACIENS</i> | 359 |
| María J. RUIZ; Margarita CHAVES; Luis ZEA; Lourdes MOYANO; Manuel MEDINA | |
| FAMÍLIAS DE AROMAS DE MOSTOS PROVENIENTES DE UVAS SECAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ | 369 |

* Departamento de Viticultura. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Ctra. Burgos, km 119, 47071 Valladolid (España). Email: arrherce@itacyl.es

** Departamento de Biología Vegetal. ETSI Agrónomos, UPM
Ciudad Universitaria, 28040 Madrid (España)

Vincent Renouf, Marie-Laure Murat, Virginie Moine

**UTILIZAÇÃO DE “STARTERS” DE FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA
PARA CONTROLAR AS ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS** 379

Helena CARVALHO; Sandra SANTOS; Fernando J. GONÇALVES
**ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES
FRACÇÕES FENÓLICAS DE VINHOS TINTOS DA REGIÃO DO DÃO** 387

Fernando J. GONÇALVES ; Raquel R. RAMIREZ ; Sandra L. SANTOS,
Ana C. CORREIA; António M. JORDÃO
**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA DE VINAGRES COMERCIALIZADOS NO MERCADO
PORTUGUÊS** 397

Sofia CATARINO; António Sérgio CURVELO-GARCIA
**A ANÁLISE MINERAL DE VINHOS. METODOLOGIAS IMPLEMENTADAS
NO LABORATÓRIO DO INIA-DOIS PORTOS** 405

María de las Nieves LÓPEZ DE LERMA ; José PEINADO ; Juan J. MORENO ;
Rafael A. PEINADO
**EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ACTIVIDADE
ANTIOXIDANTE DURANTE O PROCESSO DE SECAGEM PÓS COLHEITA
DE UVAS PEDRO XIMÉNEZ** 417

Teresa GARCÍA-MARTÍNEZ; Nieves LÓPEZ DE LERMA; Juan MORENO;
Rafael PEINADO; Juan C. MAURICIO
**EFEITO DA BIO-IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS OSMOTOLERANTES
NOS ÁLCOOIS SUPERIORES EM VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ
PARCIALMENTE FERMENTADOS** 427

Deolinda MOTA; Ana C. P. M. das Neves LUÍS; Otilia CERVEIRA; Ofélia ANJOS;
Sara CANAS; Ilda CALDEIRA
**TEORES DE METANOL EM AGUARDENTES VÍNICAS E BAGACEIRAS
PORTUGUESAS** 437

Maria João CABRITA; Raquel PATÃO; Ana Maria COSTA FREITAS
**OS FENOIS VOLÁTEIS E OS SEUS PRECURSORES EM SOLUÇÕES
MODELO E EM VINHO** 447

Raquel GARCIA; Margarida VIEIRA; Maria João CABRITA
**UTILIZAÇÃO DE APARAS DE MADEIRA NO ENVELHECIMENTO
DE VINHOS TINTOS: QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICAS
DE MADEIRAS POR HPLC** 457

Francisco PÉREZ-NEVADO, Matilde MAQUEDA, José A. REGODÓN, Emiliano
ZAMORA, M. Luz ÁLVAREZ, Manuel RAMÍREZ
DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO ECONÓMICO DE PRODUÇÃO

| | |
|--|------------|
| DE LEVEDURAS AUTÓCTONES SELECCIONADAS PARA ELABORAR VINHOS À ESCALA LOCAL | 467 |
| Ana NEVES , Sofia CATARINO, Raul BRUNO DE SOUSA | |
| UTILIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS TRATADAS PARA REGA DA VINHA E SUA INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MOSTO | 477 |
| Anabela CARNEIRO ; Mário CUNHA; Óscar PEREIRA; Jorge QUEIROZ | |
| AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA VIDEIRA PELO SISTEMA INTEGRADO DE DIAGNÓSTICO E RECOMENDAÇÃO (DRIS) | 487 |

AValiação DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRAVARIETAL DAS CASTAS VIA DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS PARCIALMENTE REPETIDOS

Elsa GONÇALVES¹; Antero MARTINS¹; L.C. CARNEIRO²; Maria Clara ROQUE-VALE³; Maria Alice PRATES³; Filipe PERDIZ⁴; Carlos FIALHO³; Joaquim CORREIA³

RESUMO

Analisa-se a viabilidade da utilização de ensaios não repetidos, também designados por parcialmente repetidos, para a guarda e quantificação da variabilidade genética intravarietal de castas antigas de videira.

Resultados já obtidos por estudos de simulação suportam a possibilidade da avaliação preliminar da variabilidade genética de variedades antigas através de ensaios parcialmente repetidos, desde que contenham um número de genótipos superior a 250 e, no mínimo, 33% das parcelas com genótipos testemunha. Utilizando dados de rendimento da casta Tinta Barroca provenientes de dois ensaios intalados em Reguengos de Monsaraz, compara-se a eficiência de um delineamento em blocos completos casualizados aumentados com a dos convencionais delineamentos totalmente repetidos para a quantificação da variabilidade genética desta casta. Confrontam-se estes resultados com as bases metodológicas já estabelecidas através de trabalhos de simulação anteriores.

Palavras-chave: delineamentos experimentais, ensaios não repetidos, variabilidade genética, videira.

1 - INTRODUÇÃO

Os ensaios não repetidos, também designados por parcialmente repetidos, são frequentemente utilizados nas primeiras fases de um processo de melhoramento genético

¹ CBAA/DBEB, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa. elsagoncalves@isa.utl.pt

² Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P./L-INIA, 2784-505 Oeiras

³ Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo, Qta da Malagueira, 7002-553 Évora

⁴ Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo, Rua Fernanda Seno 14, 7002-506 Évora

de plantas (Kempton e Gleeson, 1997; Williams e John, 2003; Cullis *et al.* 2006; Martin *et al.* 2006). Estes ensaios iniciais caracterizam-se por terem um número elevado de tratamentos, normalmente da ordem das centenas, uns repetidos – tratamentos testemunha - e outros não repetidos – tratamentos teste. O objectivo central destes ensaios é fazer uma avaliação preliminar da variabilidade genética (como matéria prima disponível para o melhoramento) e de seleccionar um sub-grupo de genótipos para estudos posteriores mais precisos (normalmente cerca de 1/3), pelo que deles não são esperados mais do que resultados preliminares e ganhos genéticos moderados.

Com o objectivo de implementar este tipo de delineamento para a quantificação da variabilidade genética de castas de segunda linha pouco cultivadas e de identificar quais as condições que viabilizam essa quantificação com eficiência, foram já anteriormente desenvolvidos estudos metodológicos de simulação (Gonçalves, 2008). Esses estudos apontaram para a possibilidade de avaliação da variabilidade genética através de ensaios parcialmente repetidos (delineamentos alfa-alfa e em blocos completos casualizados aumentados), desde que contendo um número de genótipos teste superior a 250 e, no mínimo, 33% das parcelas com genótipos testemunha. No que respeita à realização da selecção massal genotípica, a utilização desse tipo de delineamento revelou-se menos eficiente.

Na expectativa de pôr em prática esta nova linha metodológica, nos últimos anos têm - se instalado ensaios de campo não repetidos com vista à confirmação dos resultados teóricos obtidos via simulação. O primeiro ensaio com este tipo de delineamento foi instalado em 2006, em Reguengos de Monsaraz, com a variedade Tinta Barroca, e são precisamente os primeiros dados de rendimento nele obtidos que são aqui analisados. Para tal, compara-se a eficiência de um delineamento em blocos completos casualizados aumentados com a dos convencionais delineamentos em blocos completos casualizados para quantificação da variabilidade genética do rendimento desta casta, confrontando - se os resultados obtidos com as linhas gerais já estabelecidas através de trabalhos de simulação.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Ensaio instalados e delineamentos experimentais

Os dados utilizados referem-se ao rendimento observado em 2008 e 2009 em duas populações experimentais de clones (POP) da casta Tinta Barroca, instaladas na Herdade da Revilheira, em Reguengos de Monsaraz. Uma dessas populações foi instalada segundo um delineamento experimental resolúvel em blocos completos casualizados (RCB), sendo cada bloco completo constituído por um arranjo linha \times coluna, tendo-se 210 clones \times 4 repetições resolúveis (blocos completos casualizados) \times 3 plantas/parcela. A outra POP, foi instalada segundo um delineamento experimental em blocos completos casualizados aumentados (ARCB), com $c = 5$ genótipos testemunha, repetidos em 42 blocos completos, e $q = 210$ genótipos teste. Cada bloco completo aumentado ficou constituído por 10 parcelas (3 plantas/parcela), tendo-se 50% das parcelas ocupadas com genótipos testemunha e 50% com genótipos teste.

2.2 - Modelos e análise estatística

Os diversos modelos ajustados aos dados encontram-se sintetizados no Quadro 1. Sendo o objectivo central desta análise a estimação da componente de variância genotípica (σ_g^2), os efeitos genotípicos (μ_i) foram considerados como aleatórios. Nos modelos ARCB e ARCB-SP os efeitos dos genótipos testemunha assumiram-se como fixos. Relativamente aos erros aleatórios consideraram-se duas variantes, correspondentes ao ajustamento de duas classes de modelos: modelos RCB e ARCB (não espaciais), assumindo os erros aleatórios (ϵ_i) independentes e idênticamente distribuídos (*iid*), e modelos RCB-SP e ARCB-SP (modelos espaciais). Nestes últimos, o erro foi dividido em duas componentes, ϵ_{1i} e ϵ_{2i} , a que se referem, respectivamente, erros espacialmente correlacionados, de acordo com uma função de correlação potência anisotrópica, e erros independentes. Todos os efeitos aleatórios assumiram-se mutuamente independentes.

Nos modelos com modelação espacial da matriz de variâncias-covariâncias do erro (modelos RCB-SP e ARCB-SP) foram mantidos os efeitos associados aos factores do delineamento experimental, de modo a respeitar o processo de casualização. De

salientar que os efeitos associados aos factores do delineamento experimental, b_j (efeitos dos blocos completos, para o RCB, e dos blocos completos aumentados, para o ARCB), assumiram-se sempre como factores de efeitos aleatórios.

A análise dos dados foi feita recorrendo ao procedimento *Proc Mixed* (Littell *et al.* 2006) do SAS, versão 9.1 (SAS Institute 2003), com adaptações do código do SAS de Wolfinger *et al.* (1997) e Federer e Wolfinger (1998), no caso do delineamento ARCB.

Os parâmetros envolvidos nos modelos foram estimados pelo método da máxima verosimilhança restrita (REML) (Patterson e Thompson, 1971), usando o algoritmo dos Scores de Fisher (Jennrich e Sampson, 1976). Modelos encaixados com estruturas de variâncias - covariâncias do erro distintas foram comparados através de um teste de razão de verosimilhanças (testando-se, deste modo, a variabilidade espacial).

Quadro 1 – Modelos ajustados aos dados de rendimento provenientes das POPs com delineamento RCB e ARCB (i e j , efeitos independentes e idênticamente distribuídos com distribuição Normal; $f(d)$, função de correlação potência anisotrópica)

| Delineamento | Modelo |
|--------------|--|
| RCB | Modelo RCB $y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$ para $i=1, \dots, 210$, $j=1, \dots, 4$, com $g_i \sim \text{iid } N(0, \sigma_g^2)$, $b_j \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$ e $e_{ij} \sim \text{iid } N(0, \sigma_e^2)$ |
| | Modelo RCB-SP $y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij} + \eta_{ij}$ para $i=1, \dots, 210$, $j=1, \dots, 4$, com $g_i \sim \text{iid } N(0, \sigma_g^2)$, $b_j \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$, $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2 f(d))$ e $\eta_{ij} \sim \text{iid } N(0, \sigma_\eta^2)$ |
| ARCB | Modelo ARCB $y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$ para $i=1, \dots, q+1, q+c$ ($q=210$ e $c=3$), $j=1, \dots, 4$, com $g_i \sim \text{iid } N(0, \sigma_g^2)$ para $i=1, \dots, q$, $b_j \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$ e $e_{ij} \sim \text{iid } N(0, \sigma_e^2)$ |
| | Modelo ARCB-SP $y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij} + \eta_{ij}$ para $i=1, \dots, q+1, q+c$ ($q=210$ e $c=3$), $j=1, \dots, 4$, com $g_i \sim \text{iid } N(0, \sigma_g^2)$ para $i=1, \dots, q$, $b_j \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$, $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2 f(d))$ e $\eta_{ij} \sim \text{iid } N(0, \sigma_\eta^2)$ |

Quanto à componente de variância genotípica, o ajustamento de cada um dos submodelos dos modelos RCB, RCB-SP, ARCB, ARCB-SP, sem efeitos genotípicos, foi comparado com o dos respectivos modelos completos, também através de um teste de razão de verosimilhanças. A quantificação da variabilidade genética entre modelos foi comparada através do coeficiente de variação genotípico ($CV_g = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\text{média dos resultados genotípicos teste}}$, no caso dos modelos RCB e RCB-SP, $CV_g = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\text{média dos resultados genotípicos teste}}$, no caso dos modelos ARCB e ARCB-SP, em que $\hat{\sigma}_g^2$ representa a estimativa da componente de variância genotípica).

A eficiência da selecção massal genotípica foi comparada através de uma medida generalizada da heritabilidade em sentido lato, definida como o quadrado da correlação entre os verdadeiros efeitos genotípicos e os efeitos genotípicos previstos (Oakey *et al.*, 2006; Gonçalves, 2008). O procedimento estatístico para testar a hipótese de heritabilidade nula foi idêntico ao descrito para a variância genotípica.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois delineamentos estudados, o ajustamento dos modelos espaciais (RCB-SP, no caso do RCB, e modelo ARCB-SP, no caso do delineamento ARCB), conduziu sempre a estimativas da heritabilidade mais elevadas e a estimativas da variância genotípica mais precisas (Quadro 2). O efeito positivo da modelação espacial foi mais significativo no caso do delineamento RCB, como evidenciado pelo maior valor da estatística de razão de verosimilhanças, seguramente resultante da maior dimensão dos blocos completos neste ensaio. Concretamente, no caso do delineamento RCB os valores da estatística de razão de verosimilhanças foram de 193,1, 95,0, e 221,4, para 2008, 2009 e média de anos, respectivamente, e, no caso do delineamento ARCB, de 59,0, 59,6 e 84,5. De salientar que a maior eficiência no controlo da variação espacial poderia

Quadro 2 - Modelos ajustados aos dados de rendimento da Tinta Barroca (kg/planta), em 2008, em 2009, e à média dos dois anos e respectivas estimativas da variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$) e da herdabilidade em sentido lato generalizada (\hat{h}^2), coeficiente de variação genotípico (CV_g) e estatística do teste de razão de verossimilhanças (λ)

| Ano | Modelos | $\hat{\sigma}_g^2$ (SE) | \hat{h}^2 (%) | CV_g (%) | λ |
|------------------|-----------|----------------------------|-----------------|------------|--------------|
| 2008 | 1-RCB | 0,2344 (0,0666) | 36,6 (****) | 17,4 | |
| | 2-RCB-SP | 0,2312 (0,0532) | 42,8 (****) | 15,5 | 103,1 (****) |
| | 3-ARCB | 0,5721 (0,2351) | 29,3 (****) | 27,8 | |
| | 4-ARCB-SP | 0,5148 (0,1961) | 31,6 (****) | 25,0 | 99,0 (****) |
| 2009 | 1-RCB | 0,08280 (0,02608) | 41,7 (****) | 23,3 | |
| | 2-RCB-SP | 0,08008 (0,0333) | 44,8 (****) | 20,5 | 95,0 (****) |
| | 3-ARCB | 0 | 0 (n.s.) | 0 | |
| | 4-ARCB-SP | 0 | 0 (n.s.) | 0 | 99,0 (****) |
| Média dos 2 anos | 1-RCB | 0,1237 (0,03183) | 40,2 (****) | 17,5 | |
| | 2-RCB-SP | 0,1398 (0,02527) | 48,4 (****) | 15,8 | 221,4 (****) |
| | 3-ARCB | 0,1563 (0,1342) | 17,4 (n.s.) | 19,9 | |
| | 4-ARCB-SP | 0,1461 (0,08917) | 20,8 (*) | 15,3 | 84,5 (****) |

SE = erro padrão assintótico;

$\lambda = -2\ln$ do modelo RCB/ $-2\ln$ do modelo RCB-SP, ou $\lambda = -2\ln$ do modelo ARCB/ $-2\ln$ do modelo ARCB-SP, sendo $-2\ln$ menos duas vezes a log-verossimilhança restrita;

n.s. = não significativo; * significativo para um nível de significância (α) de 0,05; ** significativo para $\alpha=0,01$; *** significativo para $\alpha=0,001$.

ter sido conseguida se, no caso do ensaio totalmente repetido, tivessem sido adoptados delineamentos alfa ou linha-coluna e, no caso do ensaio parcialmente repetido, um delineamento alfa-alfa (devido ao maior número de factores para controlo da variação espacial associados a estes tipos de delineamentos experimentais).

Quanto à quantificação da variabilidade genética, no caso do delineamento RCB, observou-se que a variabilidade genética detectada foi sempre significativa, em 2008, em 2009 e relativamente à média dos dois anos. Na população experimental de clones com delineamento ARCB verificou-se que estimar a variabilidade genética apenas com um ano de avaliação é muito problemático, tendo a mesma sido sobreestimada em 2008 e subestimada em 2009. Estes resultados, até certo ponto, eram previsíveis, uma vez que os estudos de simulação já realizados evidenciaram apenas boas estimativas da componente de variância genotípica para ensaios contendo acima de 240-250 genótipos teste. Neste caso, estamos com um número inferior de genótipos e, além disso, estamos a tra-

balhar com um casta que revela moderada variabilidade genética (evidenciada pelos valores do CV_G), o que contribuiu para estes resultados mais problemáticos. Sendo assim, observou-se que é necessária a utilização de dados de vários anos para se atingir alguma estabilização e aproximação à verdadeira variância genotípica. Isto é, com o aumento do número de anos, a respectiva média das avaliações conduziu a menor viés e maior precisão associados à estimativa da variância genotípica da casta. Neste estudo, apenas com médias de dois anos tal foi razoavelmente conseguido, um vez que os resultados obtidos para a variabilidade genética com os delineamentos RCB e ARCB tenderam a aproximar-se. Com o ajustamento do modelo ARCB-SP o valor obtido para a POP com ARCB foi de 15,3%, muito próximo do obtido para a POP com RCB, 15,8%. No entanto, convém prosseguir com as avaliações para confirmar estas conclusões. Ainda assim, a estimativa obtida para a componente de variância genotípica (σ_g^2) merece alguns comentários. O erro padrão assintótico associado a essa σ_g^2 foi sempre maior no caso do ARCB e, como consequência, essa componente de variância foi estimada com menor precisão comparativamente à dos modelos RCB e RCB - SP. Apenas se conseguiu ter variabilidade genética significativa com o modelo ARCB-SP (Quadro 2).

Quanto à heritabilidade, como esperado, obtiveram-se estimativas mais elevadas para os dados provenientes da população experimental com delineamento RCB, e mais ainda com o ajustamento do modelo RCB-SP. Quanto à POP com ARCB, as maiores estimativas de heritabilidade conseguiram-se também com o ajustamento do modelo ARCB-SP. Concretamente, relativamente à média de anos, com o ajustamento do modelo espacial a estimativa da heritabilidade aumentou de 40,2% para 48,4%, no caso da POP com delineamento RCB, e de 17,4% para 20,8%, no caso da POP com ARCB, acompanhada também do aumento da sua significância estatística.

Na POP com delineamento RCB os moderados valores obtidos para as estimativas de heritabilidade, revelando moderada variabilidade genética, indicam que os ganhos genéticos de selecção serão igualmente limitados. Os valores ainda mais baixos obtidos para a POP com ARCB acentuam a pouca viabilidade destes ensaios para efeito de selecção.

4 - CONCLUSÕES

Os resultados sustentam que o procedimento adequado para uma eficiente quantificação da variabilidade genética tem que abranger não só os delineamentos experimentais como também os modelos de análise.

Verifica-se ainda que, na ausência de objectivos imediatos de selecção, a conservação e quantificação da variabilidade genética de variedades antigas de videira de segunda linha pouco cultivadas é viável através de ensaios com delineamentos não repetidos. No entanto, tal como previsto por estudos teóricos, a utilização de delineamentos ARCB com um número inferior a 250 genótipos teste exigirá sempre maiores cuidados. Nestas circunstâncias, a quantificação da variabilidade genética deverá repousar sempre sobre vários anos de avaliações e no recurso a modelos de análise espacial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cullis B.R., Smith A.B., Coombes N.E. (2006). On the design of early generation variety trials with correlated data. *J Agr Biol Envir St* **11**(4):381-393.
- Federer, W.T., Wolfinger, R.D. (1998). SAS Code for Recovering Intereffect Information in Experiments with Incomplete Block and Lattice Rectangle Designs. *Agronomy Journal* **90**:545-551.
- Gonçalves, E. (2008). *Modelos estatísticos espaciais para ensaios de populações vegetais*. Dissertação de doutoramento em Matemática e Estatística. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Jennrich, R.I., Sampson, P.F. (1976). Newton-Raphson and related algorithms for maximum likelihood variance component estimation. *Technometrics* **18**(1):11-17.
- Kempton R.A., Gleeson A.C. (1997). Unreplicated trials. In: Kempton RA, Fox PN (eds) *Statistical methods for plant variety evaluation*. Chapman & Hall, London, pp 86-100.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., Schabenberger, O. (2006). *SAS system for mixed models*. 2nd ed.. SAS Institute, Cary, NC.
- Martin R.J., Chauhan N., Eccleston J.A., Chan B.S.P. (2006). Efficient experimental designs when most treatments are unreplicated. *Linear Algebra Appl* **417**:163-182.
- Oakey, H., Verbyla, A., Pitchford, W., Cullis, B., Kuchel, H. (2006). Joint modelling of additive

and non-additive genetic line effects in single field trials. *Theoretical and Applied Genetics* **113**:809-819.

Patterson H.D., Thompson R. (1971). Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika* **58**: 545-554.

SAS Institute (2003). *SAS proprietary software release 9.1*. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Williams E.R., John J.A. (2003). A note on the Design of Unreplicated Trials. *Biometrical Journal* **45**(6):751-757.

Wolfinger R.S., Federer W.T., Cordero-Brana O. (1997). Recovering information in augmented designs, using SAS PROC GLM and PROC MIXED. *Agronomy Journal* **89**:856-859.



EFEITO DA APLICAÇÃO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO ‘PROHEXADIONA DE CÁLCIO’ (REGALIS®) NA CASTA ALVARINHO (*V. VINIFERA L.*) NA REGIÃO DOS VINHOS VERDES

Teresa MOTA¹; Joana MENEZES²; João GARRIDO¹; Mário CUNHA² e Jorge QUEIROZ^{2,3}

RESUMO

O equilíbrio entre o rendimento e a qualidade vitícola de cada ano de produção depende muito da poda e do acompanhamento vegetativo ao longo da Primavera-Verão. O cultivo do Alvarinho, uma das castas mais nobres da região dos Vinhos Verdes, revela a importância da condução desta casta. Dada a exagerada dimensão dos seus entre-nós e consequentemente das suas varas, esta casta é conduzida maioritariamente em formas que permitam a sua extensão (ramadas; cruzeta; cordão simples retombante). A recente opção por formas de condução com maior índice de mecanização, como o cordão simples ascendente (VSP - Vertical Shoot Positioning), determina nesta casta níveis de produção muito afastados do eixo da planta e a necessidade do recurso mais frequente a despontas. Neste sentido, aplicou-se um regulador de crescimento, no caso a Prohexadiona de Cálcio (REGALIS®), com o objectivo de reduzir a dimensão dos entre-nós e o comprimento das varas. O ensaio foi realizado em 2009, tendo-se feito um estudo preliminar no ano anterior, que revelou de facto uma redução do comprimento médio dos lançamentos, e consequentemente da altura média da sebe, evitando a realização de uma desponta nas modalidades tratadas, sem que tenha havido quebra de produção ou perda da qualidade dos mostos; em 2009, introduziu-se uma modalidade com a aplicação da dose máxima de 3 kg/ha realizada numa só data, que provocou uma perda significativa de produção em relação à testemunha e à modalidade de aplicação faseada em duas datas.

Palavras-chave: Vinho Verde; Alvarinho; regulador de crescimento; intervenções em verde.

¹ CVRVV. Estação Vitivinícola Amândio Galhano. Campos de Lima. 4970-249 PAÇÕ AVV. Portugal. E-mail : evag@vinhoverde.pt

² UP. Faculdade de Ciências. Secção Autónoma de Ciências Agrárias. Praça Gomes Teixeira, 4000 Porto. Portugal. E-mail: jqueiroz@fc.up.pt

³ Laboratório Associado REQUIMTE/SAECA, FCUP, Universidade do Porto.

1. INTRODUÇÃO

O equilíbrio entre o rendimento e a qualidade vitícola de cada ano de produção depende muito da poda e do acompanhamento vegetativo ao longo da Primavera-Verão. O cultivo da casta nobre Alvarinho na região dos Vinhos Verdes, revela a importância da sua condução, dada a exagerada dimensão dos seus entre-nós e consequentemente das suas varas; esta é a razão principal por que esta casta é conduzida maioritariamente em formas que permitam a extensão das varas (ramadas; cruzeta; cordão simples re-tombante). Recentemente, a opção por formas de condução mais mecanizáveis, como o cordão simples ascendente, designado *Vertical Shoot Positioning* (VSP), determina que nesta casta os cachos surjam a um nível muito afastado do eixo da planta, havendo necessidade de despontas mais frequentes.

Há muita experiência e resultados da aplicação da ProCa em pomóideas no controlo do vigor e dimensões da copa, que reduzem consideravelmente os custos em mão-de-obra com as podas de Verão e Inverno, entre outras vantagens (SILVA, 2005). Em *Vitis vinifera L.* há trabalhos desenvolvidos por LO GIUDICE (2003) nos EUA, que apontam para reduções de crescimentos quando aplicados num período pré-floral, mas que pode ter em simultâneo um efeito de quebra de produção; este problema não se coloca com as pomóideas pois o grande incremento do crescimento ocorre nos 30 dias após a plena floração (BYERS & YODER, 1999, cit. SILVA, 2005), pelo que a 1ª aplicação é normalmente feita sem problemas ‘à queda das pétalas’. Por outro lado, para se obterem reduções significativas nos crescimentos do ano com o regulador de crescimento, é necessário iniciar as aplicações muito cedo, pois como refere HUGLIN (1986), os entre-nós estão pré-formados nos gomos latentes das varas do ano anterior dependendo depois das condições naturais ou artificiais a definição do tamanho final, pelo alongamento das células imediatamente após o abrolhamento. O objectivo deste estudo é determinar a melhor combinação da dose e data de aplicação, para obtermos reduções de crescimento das varas do Alvarinho sem perdas de produção, uma vez que esta casta, apesar de muito fértil, é pouco produtiva, dada a pequena dimensão dos seus cachos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio decorreu na Estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG) situada no concelho dos Arcos de Valdevez (41° 48'N e 8° 25'W) num Campo de Multiplicação Policlonal da casta Alvarinho (Parcela D3.1) com um conjunto de clones enxertados em 196-17Cl, conduzidos em Cordão Simples Ascendente a 1,05m do solo e com um compasso de plantação de 2,75 x 2,50m.

O solo da parcela é caracterizado por ARMADA (1990) como um Cambissolo úmbrico, moderadamente espesso, sem riscos de erosão, de permeabilidade moderadamente lenta e de drenagem interna e externa regular. A capacidade de água utilizável é moderada (174,3mm). O solo é ácido, com alto teor em azoto, mas baixo em fósforo e potássio, com teor em bases de troca baixo e fortemente lexiviado.

A aplicação da Prohexadiona de Cálcio (ProCa) foi feita sob a apresentação comercial da BASF com a designação de Regalis®, que doseia 10% de ProCa, dose esta inferior à do produto Apogee® comercializado nos EUA, que doseia 27,5% (LO GIUDICE *et al*, 2003).

O ensaio decorreu nos anos de 2008 e 2009 tendo-se testado diferentes combinações de doses e datas de aplicação de acordo com as modalidades referidas no Quadro 1. O ensaio foi delineado em blocos casualizados, com quatro repetições. Para as respostas aos factores cujas médias revelaram diferenças significativas na análise de variância, procedemos à avaliação dessas diferenças com a realização do teste de Duncan, com uma probabilidade de erro de 5 %.

Os crescimentos dos entre-nós foram observados semanalmente em quatro videiras e em dois lançamentos por videira.

A 1ª aplicação, em 2008, foi condicionada pela grande irregularidade na rebentação do ano, tendo sido realizada com 80% dos olhos na Fase G (cachos separados, na Escala de Baggiolini) e 20% na Fase H (botões florais separados); a 2ª aplicação foi feita 21 dias após, imediatamente antes da Floração (Fase I) e a 3ª aplicação na Fase K (bago de ervilha), só realizada na modalidade R3 (Regalis 3), conforme Quadro 1.

Quadro 1- Modalidades de estudo (**T:** Testemunha; **R1:** Regalis 1_aplicação; **R2:** Regalis 2_aplicações e **R3:** Regalis 3_aplicações)

| MODALIDADE | 1ª aplicação | 2ª aplicação | 3ª aplicação | TOTAL |
|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------|------------|
| | 28/04/08 08/04/09 | 19/05/08 15/05/09 | 23/06/08 - | |
| R1 (2009) | 3,0 kg /ha | - | - | 3,0 kg /ha |
| R2 (2008) (2009) | 1,5 kg /ha | 1,5 kg /ha | - | |
| R3 (2008) | 1,5 kg /ha | 1,0 kg /ha | 0,5 kg /ha | |
| T (2008) (2009) | - | - | - | - |

Em 2009, a 1ª aplicação foi efectuada quando as videiras estavam com 100% dos cachos separados (Fase G), correspondendo a uma aplicação mais precoce que no ano anterior. O período que decorreu entre o abrolhamento e a floração foi muito frio, pelo que o desenvolvimento vegetativo foi fraco, e quando se procedeu à 2ª aplicação, imediatamente antes da floração (Fase I), os lançamentos estavam de um modo geral pouco desenvolvidos.

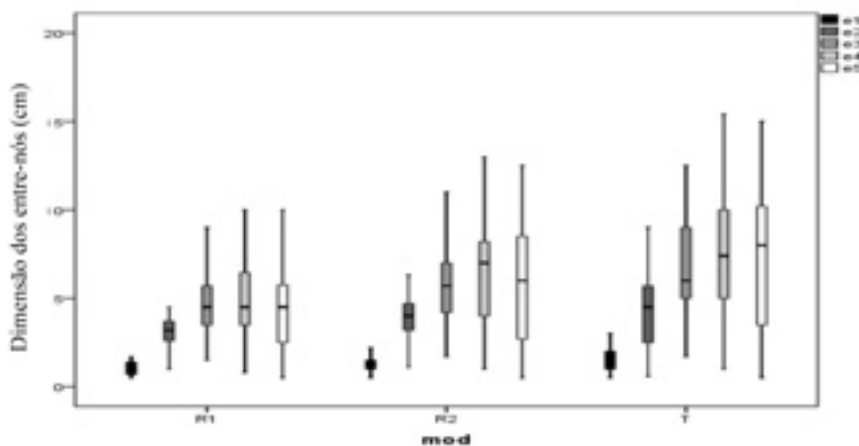
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o primeiro ano de ensaio, verificou-se uma redução dos crescimentos nas modalidades tratadas, a níveis muito elevados nos entre-nós 11º e 12º, após a 1ª aplicação, 13º e 14º, após a 2ª aplicação, e sem efeito com a 3ª aplicação (PEREIRA, 2008). Na sequência destes resultados, e dado que o efeito da ProCa está mais dependente da dose de aplicação do que do número de aplicações, no ano seguinte ensaiou-se a modalidade (R1) com a dose tida como máxima admissível (3 kg/ha) numa só aplicação, razão pela qual os resultados aqui apresentados incidem essencialmente sobre o ano de 2009.

3.1. Regulação do crescimento dos entre-nós

Um dos objectivos da aplicação do regulador de crescimento na casta Alvarinho, não foi conseguido em 2008 dado que a época×dose da 1ª aplicação foi insuficiente enquanto que em 2009 se verificou uma redução evidente da dimensão média dos primeiros entre-nós nas modalidades tratadas (Figura1).

Figura 1- Dimensão média dos primeiros 5 entre-nós nas três modalidades em 2009 (**R1:** Regalis 1_aplicação; **R2:** Regalis 2_aplicações; **T:** Testemunha). As “caixas de bigodes” representam a dispersão dos valores em relação à mediana, e os valores máximos e mínimos observados.



A testemunha revela a dimensão típica dos entre-nós da casta Alvarinho, sendo o entre-no 2 (e_2) já de dimensão considerável, isto é, o triplo do e_1 , surgindo entre-nós com dimensão máxima de 15cm ao nível e_4 e e_5 . A ProCa actuou ao nível dos entre-nós e_2 , e_3 , e_4 e e_5 comparando com a testemunha, e enquanto na modalidade R1 igualou a dimensão média dos entre-nós e_3 , e_4 e e_5 , na R2 manteve o progressivo aumento à semelhança da testemunha até ao e_4 e reduziu o e_5 para um tamanho de mediana próxima da do e_3 .

Na Figura 2 pode observar-se a dimensão média de todos os entre-nós nas diferentes modalidades, e que na testemunha revela o fenómeno de crescimento rítmico por grupo de 3, referido por HUGLIN (1986).

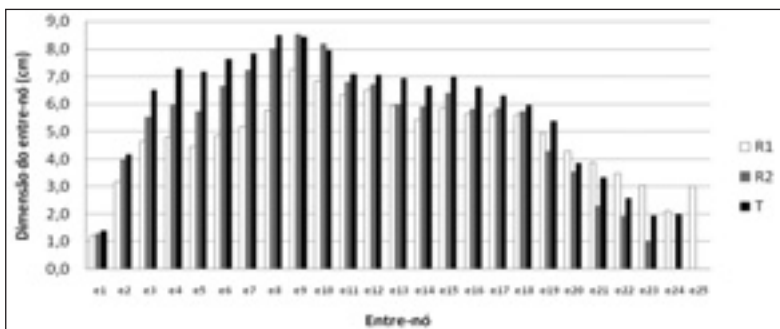
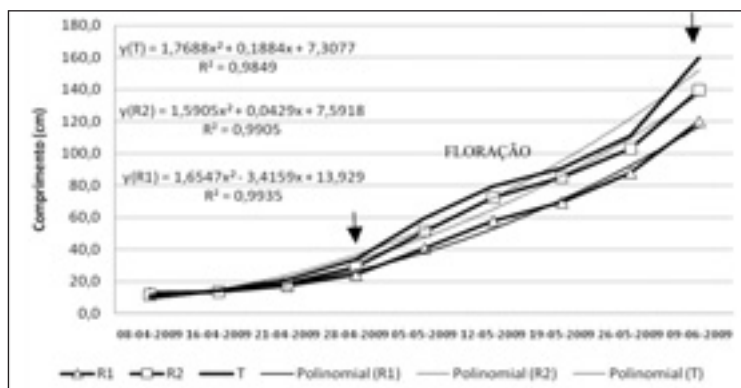


Figura 2- Dimensão média dos entre-nós nas três modalidades em 2009. (R1: Regalis 1_aplicação; R2: Regalis 2_aplicações; T: Testemunha).

Até ao e8 verifica-se uma redução em R2 e R1 relativamente à testemunha, mais acentuada no R1. Nesta modalidade, nota-se que a partir do e19 o efeito da Pro-Ca deixa de se verificar, ultrapassando mesmo a dimensão dos entre-nós da testemunha. Na modalidade R2 mantém-se o efeito da ProCa dado que levou uma 2ª aplicação a 15/05/09, tendo terminado o crescimento ao entre-nó e23.

Figura 3- Evolução do crescimento médio dos lançamentos nas três modalidades de 2009. (R1: Regalis 1_aplicação; R2: Regalis 2_aplicações; T: Testemunha;). As setas indicam o efeito da ProCa após 3 semanas das 2 aplicações (8 Abril e 15 Maio).



Na Figura 3 pode-se verificar a redução do crescimento cerca de 3 semanas após a 1ª aplicação em R1 e R2, e após a 2ª aplicação para R2, havendo uma ligeira paragem no crescimento à floração.

Para ambas as modalidades testadas, procedeu-se ao ajustamento de modelos de regressão à evolução temporal do comprimento do sarmento. Os modelos de regressão são estatisticamente significativos ($R^2 > 0,985$; $n=9$; $p < 0,001$), em todas as modalidades.

3.2. Área foliar total e dimensão da sebe

O efeito da ProCa na área foliar é indicado por SILVA (2005) sem repercussões negativas, dado que o número de folhas principais não é afectado, sendo mesmo superior para a mesma altura da sebe ao admitir maior número de entre-nós; todavia, neste ensaio verificou-se uma diminuição da área foliar total das modalidades tratadas em relação à testemunha (Quadro 2 e Figura 4), que se deve à diminuição significativa do tamanho médio das folhas principais das modalidades tratadas em relação à testemunha, embora em maior número.

Quadro 2 – Comparação das médias das componentes da Área Foliar nas três modalidades em 2009. (**R1**: Regalis 1 aplicação; **R2**: Regalis 2 aplicações; **T**: Testemunha)

| MODALIDADE | Folhas Principais (n°) | Área Foliar Principal (cm ²) | Folhas Netas (n°) | Área Foliar Netas (cm ²) | Área Foliar Total (cm ²) |
|------------|------------------------|--|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| R1 | 16 a | 43792 a | 25 | 24839 a | 72230 a |
| R2 | 17 a | 45254 a | 25 | 28799 a | 74053 a |
| T | 14 b | 54981 b | 26 | 38594 b | 93575 b |
| Sig. | 0.006 | 0.014 | ns | 0.018 | 0.007 |

Sig.: Significância do teste F (Fischer) obtido na ANOVA

Na mesma coluna médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Na evolução da dimensão da sebe (Figura 4), a testemunha apresentou regularmente valores maiores de altura, ultrapassando os 140 cm no início de Julho.

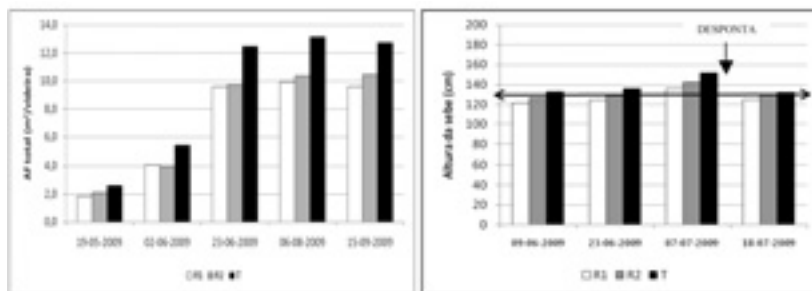


Figura 4 – Evolução da Área Foliar total (esquerda) e da Dimensão da sebe (direita) nas três modalidades em 2009. (R1: Regalis 1 aplicação; R2: Regalis 2 aplicações; T: Testemunha).

Neste sistema de condução e com a casta Alvarinho, sebes muito acima do último arame (indicada com uma seta) correm elevados riscos de tombar, se não forem despontadas. Verificou-se a necessidade de despona a 07/07 para a testemunha. Quanto às netas, não há diferenças significativas no número de folhas mas a correspondente área foliar é igualmente superior na testemunha.

3.3. Produção, vigor e qualidade dos mostos

A análise do comportamento vegetativo e produtivo da casta Alvarinho face a este regulador de crescimento é fundamental, dado o efeito de quebra de produção induzido pela ProCa. Neste ensaio (Quadro 3) tal quebra revelou-se significativa para a modalidade R1 (3 kg/ha), o que é indesejável para uma casta de fraca produtividade como o Alvarinho; neste processo esteve envolvida uma diminuição do peso médio dos bagos, e conseqüentemente no peso médio do cacho, à semelhança do que verificou FERNANDEZ *et al.* (2009). A qualidade do mosto não foi afectada, tendo tido um contributo idêntico em termos de área foliar, da ordem dos 17 cm²/g uva e em termos de superfície foliar exposta de 0,59 m²SFE/kg uva (R1), 0,51 m²SFE/kg uva (R2) e de 0,46 m²SFE/kg

uva (T), o que pode de algum modo explicar a tendência de maior teor alcoólico nas modalidades tratadas.

Quadro 3 – Comparação das médias dos componentes da vindima nas três modalidades de 2009, por videira. (**R1**: Regalis 1_aplicação; **R2**: Regalis 2_aplicações; **T**: Testemunha)

| MOD | Cachos (n°) | Peso Cachos (kg) | Peso médio Cacho (kg) | Peso 100 Bagos (g) | Alcool Provável (%) | Acidez Total (g tart/L) |
|------|-------------|------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| R1 | 66,4 | 5,275 b | 0,080 b | 139,3 b | 13,2 | 5,94 |
| R2 | 63,1 | 6,437 ab | 0,101 a | 148,4 a | 13,4 | 5,65 |
| T | 76,3 | 7,616 a | 0,100 a | 150,5 a | 13,1 | 5,74 |
| Sig. | <i>ns</i> | <i>0.018</i> | <i>0.007</i> | <i>0.000</i> | <i>ns</i> | <i>ns</i> |

Sig.: Significância do teste F (Fischer) obtido na ANOVA

Na mesma coluna médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,005$).

O vigor expresso em peso da lenha de poda (varas e netas) não revelou diferenças significativas (Quadro 4), muito embora se tenha verificado uma tendência para maior número e peso de netas nas modalidades tratadas, à semelhança do que verificou LO GIUDICE *et al.* (2003).

Quadro 4 – Componentes do vigor nas três modalidades de 2009 por videira. (**R1**: Regalis 1_aplicação; **R2**: Regalis 2_aplicações; **T**: Testemunha)

| MOD | Varas (n°) | Peso Varas (kg) | Netas (n°) | Peso Netas (kg) | Peso Total (kg) | Peso Netas / Peso total |
|------|------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| R1 | 30,6 | 2,994 | 42,5 | 0,570 | 3,564 | 16 % |
| R2 | 30,2 | 2,863 | 38,1 | 0,388 | 3,250 | 12 % |
| T | 32,5 | 3,181 | 28,5 | 0,316 | 3,498 | 9 % |
| Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Sig.: Significância do teste F (Fischer) obtido na ANOVA; ns - não significativo

A maior percentagem de netas no peso total do sarmento, pode explicar a maior superfície foliar exposta das modalidades tratadas.

4. CONCLUSÃO

O efeito do regulador de crescimento ProCa depende da época de realização e da dose de aplicação. A aplicação única da dose 3 kg/ha, originou uma diferença mais evidente na redução do crescimento, mas com quebra significativa de produção. A utilização da mesma dose, mas distribuída por duas aplicações (modalidade R2), revelou-se mais interessante porque não provocou quebras de produção nem de qualidade dos mostos.

Foram conseguidas reduções significativas ao nível dos primeiros entre-nós, o que permite deixar varas de poda mais curtas e portanto com o nível de produção mais próximo do eixo da videira, verificando-se melhor adaptação desta casta ao cordão simples ascendente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HUGLIN, P. (1986). *Biologie et Écologie de la Vigne*. Éditions Payot Lausanne, Technique&Documentation, Paris, 372 pp.

LO GIUDICE, D.; WOLF, K. & MARINI, R. (2003). *Vegetative Response of Vitis Vinifera to Prohexadione-calcium*. HortScience 38 (7):1435-1438.

PEREIRA, H. (2008). Avaliação do efeito regulador de crescimento (Regalis®) no comportamento vegetativo da casta Alvarinho na região dos Vinhos Verdes, 34 pp. Relatório de Fim de Curso. ESAPL. Ponte do Lima.

FERNANDEZ,L.; ZURBANO, P.; ASENSIO, J.; ALONSO,M. & SORIA, M.T. (2009). *Treatment of grapevines with prohexadione calcium as a growth regulator. The influence on production, winemaking and sensory characteristics of wines*. J. Int. Sci. Vigne Vin, 43 (3):149-157.

SILVA, C. (2005). *Regalis®. O novo regulador de crescimento em macieira*. BASF Portuguesa.



CASTAS PRESENTES NO OESTE DE CASTILLA E LEON (ESPAÑA) E NORTE DE PORTUGAL

C. ARRANZ⁽¹⁾, J. YUSTE⁽¹⁾, J. ORTIZ⁽²⁾, J.P. MARTÍN⁽²⁾; J.A. RUBIO⁽¹⁾

RESUMO

A diversidade de castas e solos marcou muitos traços distintivos na vitivinicultura da bacia hidrográfica do rio Douro. Tanto na parte espanhola como na parte portuguesa, o mosaico vitivinícola do Douro atravessa diversas zonas com indicações geográficas de qualidade, de tal modo que permitiu que ambas as regiões desenvolvessem diversos aspectos de cultivo e do panorama varietal de forma paralela e comum.

No âmbito do interessante património varietal existente foi realizada uma minuciosa prospecção em 2006, 2007 e 2008 em determinadas zonas vitivinícolas e foi identificado um número apreciável de castas, mediante descrição ampelográfica e análise molecular (SSR).

Existe um número apreciável de variedades presentes em ambos os países, conhecidas por nomes diferentes e que representam sinonímias correspondentes a castas cultivadas em Espanha e em Portugal. Entre as castas tintas destaca-se a casta Tempranillo, com ampla difusão em ambos os países, denominada Aragonês em Portugal e Mencía (maioritariamente na DO Bierzo) conhecida como Jaen em Portugal (Denominação de Origem Controlada - Dão e Denominação de Origem Controlada - Douro). Entre as castas brancas destaca-se a Godello (DO Bierzo), cultivada como Gouveio em diferentes indicações geográficas de qualidade de Portugal e Doña Blanca ou Malvasía Castellana, com ampla difusão nos dois países e que se denomina Síria em Portugal.

Palabras- chave: análise molecular, descrição ampelográfica, património vegetal, sinonímias.

INTRODUÇÃO

As colecções de germoplasma de diferentes variedades de videiras castas no mundo, de acordo com diversas estimativas podem chegar a conter entre 5.000 e 15.000 cultivares (Lopes *et al.* 1999). Contudo, esse amplo número de variedades poderia ver-se reduzido perante a existência de sinónimos e homónimos o que representa um dos maiores problemas na gestão de determinadas colecções de germoplasma (Martín *et al.* 2003).

¹ Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda Elvas s/n. Badajoz (España).

² IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne BP 17867 21078 DIJON CEDEX (France).

³ Estación Enológica. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Extremadura. Carretera de Sevilla nº 114. Almendralejo, Badajoz (España).

⁴ Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda Elvas s/n. Badajoz (España). *E-mail:* mramirez@unex.es

Castilla e León é a região mais extensa de Espanha e alberga ambientes edafoclimáticos muito diferentes. Este factor geográfico, unido à antiga tradição vitivinícola da região, provavelmente anterior à colonização romana, faz de Castilla e León um lugar com potencial para conter uma grande diversidade varietal na vinha. (Santana *et al.* 2008).

No que respeita às variedades plantadas em Castilla e León, além de vários estudos realizados pelo ITACyl (Arranz *et al.* 2008), outros investigadores realizaram diversos trabalhos utilizando técnicas moleculares e ampelográficas (Rodríguez-Torres *et al.* 2000). Relativamente ao vasto património varietal das zonas vitivinícolas de Portugal, também existem numerosos trabalhos que permitiram identificar com precisão algumas das numerosas variedades utilizando marcadores moleculares (Baleiras-Couto *et al.* 2007).

O estudo da ampelografia como método oficial abrange uma série de caracteres determinados da casta (O.I.V. 1984), mas esta ferramenta utilizada para a caracterização do germoplasma da casta, foi complementada nos últimos anos com técnicas de marcadores de ADN (Ortiz *et al.* 2004).

Este estudo pretende identificar as castas presentes nas regiões vitivinícolas quer do Norte de Portugal, quer do Oeste de Castilla e León, mostrando as designação que existem da mesma casta em cada país, para evitar erros de denominação devido a questões idiomáticas ou à própria identificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O processo de localização e identificação das diferentes variedades começou em 2006 a partir de uma ampla prospecção na área, etiquetando numerosas castas de abundantes variedades repartidas em diferentes municípios das zonas vitivinícolas do Oeste de Castilla e León e do Norte de Portugal.

Uma vez identificadas as castas na área e realizados mapas da sua distribuição em cada parcela, procedeu-se à descrição ampelográfica, assim como a sua análise genética mediante marcadores moleculares (microsatélites, SSR).

A descrição ampelográfica foi levada a cabo durante os anos 2006, 2007 e 2008 utilizando 67 caracteres ampelográficos de acordo com os Códigos de Caracteres das variedades e espécies do tipo *Vitis* da O.I.V. (1984), ainda que dois deles tenham sido retirados do GENRES (GENRES 2001).

A recolha de dados foi realizada por três ampelógrafos, amostrando-se 10 pampamos diferentes de cinco plantas de cada variedade, estando sempre as plantas em parcelas diferentes, com o objectivo de absorver as possíveis diferenças entre plantas cultivadas em diferentes parcelas. Foram obtidos 10 dados de cada descriptor, escolhendo-se a moda dos mesmos para obter o dado final. As observações foram efectuadas de acordo com as especificações indicadas pela O.I.V. (1984) para cada órgão na época correspondente.

A análise genética realizou-se numa casta de cada variedade em cada parcela, com um grupo de microsatélites que integram vários *loci* e que foram os seguintes: VVS2, caracterizado por Thomas e Scott (1993), VVMD5 y VVMD7, caracterizados por Bowers *et al* (1996), VrZAG47, ssrVrZAG62 e ssrVrZAG79 caracterizados por Sefc *et al.* (1999).

Analisaram-se os extractos de ADN de cada indivíduo de cada uma das variedades.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 (castas tintas) e na tabela 4 (castas brancas) está indicada a denominação e as zonas de cultivo das variedades localizadas nas diversas zonas, tanto no Oeste de Castilla e León como no Norte de Portugal (Böhm *et al.* 2007, www.ivv.min-agricultura.pt).

Entre as **castas tintas** destacam-se algumas castas cuja extensão de cultivo é muito ampla não só em Espanha, mas também em Portugal (tabela 1) e que são perfeitamente conhecidas nos dois países.

Tabela 1. Superfície de cultivo (ha) das **castas tintas** com maior expressão no Oeste de Castilla e León e Norte de Portugal (Chomé et al. 2003, Böhm et al. 2007).

| DESIGNAÇÃO ESPANHOLA | SUPERFÍCIE EM CASTILLA E LEÓN | DESIGNAÇÃO PORTUGUESA | SUPERFÍCIE EM PORTUGAL |
|---|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Garnacha Tintorera, Alicante Bouschet (T) | 1.100 | Alicante Bouschet | 4.101 |
| Juan García (T) | 1.862 | Tinta Gorda | 75 |
| Mencia (T) | 8.500 | Jaen | 2.400 |
| Rufete (T) | 1.061 | Rufete, Tinta Pinheira | 5.550 |
| Tempranillo (T) | 22.900 | Aragoneza, Tinta Roriz | 23.500 |

A variedade Tempranillo, presente em toda a região de Castilla e León é sinónima de Aragonês e Tinta Roriz presente também em todo o Norte de Portugal. Mencia é a variedade principal da “Denominación de Origen (DO) Bierzo”, no Noroeste de Castilla e León também é conhecida pelo nome de Jaen nas zonas portuguesas de Denominação de Origem Controlada (DOC) Dão, DOC Douro e DOP Bairrada. Rufete, variedade principal da Serra de França (Salamanca), é Tinta Pinheira ou Rufete e está reconhecida em várias regiões com denominação de qualidade do Norte de Portugal. Garnacha Tintorera, admitida no regulamento da DO Bierzo, denomina-se Alicante Bouschet na DOP de Trás-os Montes-Chaves, DOP Trás-os-Montes–Planalto Mirandês e DOC Douro. Juan García é a casta principal da DO Arribes e está admitida como Tinta Gorda na IPR Planalto Mirandês.

Existe um segundo grupo de castas, presentes e conhecidas em diversas regiões vitivinícolas que não estão mencionadas nos regulamentos das zonas reconhecidas como marca de qualidade em ambos os países. Neste grupo encontram-se “Bastardillo Chico/Bastardo”, “Bastardillo Serrano/Cinsaut”, “Bruñal/Alfrocheiro Preto” e “Gajo Arroba/Cornifesto”.

Estas castas são cultivadas principalmente no âmbito da DO Arribes em Castilla e León são reconhecidas pelos viticultores e pelos técnicos sendo também apreciadas num passado muito recente (Garrido 2002), mas actualmente não estão abrangidas pela denominação DO, ainda que alguma delas esteja em processo de certificação.

Algumas variedades estão reconhecidas em Portugal com o seu nome nas regiões com marca de qualidade correspondentes (tabela 2). A maioria delas é cultivada já desde a antiguidade no Noroeste da Península Ibérica, já que por exemplo a casta Bruñal foi localizada por García dos Salmones (1914), em Salamanca, ainda que seja difícil ter a certeza da origem e a direcção da propagação destas castas.

Tabela 2. Designação e identidade das variedades tintas em Espanha e Portugal e regiões de cultivo.

| DESIGNAÇÃO ESPANHOLA | OESTE DE CASTILLA E LEÓN | DESIGNAÇÃO PORTUGUESA | NORTE DE PORTUGAL |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---|
| Bastardillo Chico, Morenazo (T) | DO Arribes, DO Tierra de León | Bastardo, | DOC Beira Interior, DOC Távora - Varosa, IPR Planalto Mirandês, IPR Valpaços, IPR Chaves, DOC Douro, DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Valpaços", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês" |
| Bastardillo Serrano (T) | DO Arribes | Cinsaut | 50 ha dispersas |
| Brujidera (T) | Dispersa | Marufó, Mourisco Tinto | DOC Beira Interior, DOC Távora - Varosa, IPR Planalto Mirandês, IPR Valpaços, IPR Chaves, DOC Douro, DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Valpaços", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês" |
| Braçal, Albarín Negro (T) | DO Arribes | Alfocheiro Preto | DOC Dão |
| Gajo Arriba (T) | DO Arribes | Corifeño, Tinta Serrana | DOC Douro, IPR Valpaços, DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Valpaços", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês" |
| Garnacha Tintorena, Alicante Bouschet (T) | DO Bierzo, DO Tierra de León | Alicante Bouschet | DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês", DOC Douro |
| Juan García (T) | DO Arribes | Tinta Gorda | IPR Planalto Mirandês |
| Mencia (T) | DO Bierzo | Jaen | DOC Dão, DOC Douro, DOP Bairrada |
| Puesto Mayor, Verdejo Tinto (T) | Dispersa | Saborinho | 0,9 há |
| Rafete (T) | DO Arribes, Sierra de Francia | Rafete, Tinta Pinheira | DOC Beira Interior, DOC Douro, DOC Távora - Varosa, DOP Bairrada, DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês" |
| Tempranillo (T) | Presente em toda Castilla y León | Aragonez, Tinta Roriz | DOC Douro, IPR Valpaços, DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Valpaços", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês" |
| Tinta Amarela (T) | DO Arribes | Trincadeira Preta, Tinta Amarela | IPR Planalto Mirandês, DOP "Três-os-Montes - Chaves", DOP "Três-os-Montes - Planalto Mirandês", DOC Douro |

Algumas variedades tintas cultivadas de forma dispersa em regiões de Portugal e Espanha estão indicadas nos Regulamentos de regiões com denominação de qualidade do Oeste de Castilla e León, mas o seu cultivo tem uma certa importância. São as variedades Brujidera/Marufó e Tinta Amarela/Trincadeira Preta (tabela 2), sendo esta última variedade apreciada em algumas regiões de Portugal, mas não chegou a expandir-se pelas regiões espanholas.

Por último, há uma variedade conhecida, em Espanha, como Verdejo Tinto ou Puesto Mayor localizada de forma muito isolada na DO Rueda (Yuste *et al.* 2006), que corresponde à variedade portuguesa Saborinho, cujo cultivo serve como testemunho (aproximadamente 0,9 ha em Portugal) de acordo com Böhm *et al.* (2007).

Entre as **variedades brancas** destacam-se algumas cuja extensão é muito ampla tanto em Espanha como em Portugal (tabela 3), sendo perfeitamente conhecidas em ambos os países e constituindo sinonímias claras.

Tabela 3. Superfície de cultivo (ha) das **variedades brancas** com mais extensão no Oeste de Castilla e León e no Norte de Portugal (Chomé et al. 2003, Böhm et al. 2007).

| DESIGNAÇÃO ESPANHOLA | SUPERFÍCIE DE CULTIVO DE CASTILLA E LEÓN | DESIGNAÇÃO PORTUGUESA | SUPERFÍCIE DE CULTIVO DE PORTUGAL |
|--------------------------------------|--|---|-----------------------------------|
| Doña Blanca, Malvasía Castellana (B) | 181 | Síria, Dona Branca | 11.700 |
| Godello (B) | 21 | Gouveio, Verdeño | 2.050 |
| Moscatel de Grano Menudo (B) | 22 | Moscatel Galego, Moscatel de Vago Miúdo | 500 |
| Palomino (B) | 4.800 | Malvasia Rei, Gervé | 8.500 |

A variedade Doña Branca ou Malvasía Castellana, conhecida em Portugal como Síria, está presente em ambas as regiões. Godello admitida no regulamento das DDOO Bierzo y Tierra del Vino de Zamora é sinónimo de Gouveio presente em várias regiões do Norte de Portugal. Moscatel de Grano Menudo admitida no regulamento da DO Tierra del Vino de Zamora é sinónimo de Moscatel Galego, presente em diversas regiões do Norte de Portugal. Palomino admitida nas DDOO Bierzo e Rueda é Malvasia Rei, admitida nas regiões DOC Beira Interior, Dão e Douro.

Tabela 4. Designação das **variedades brancas** em Castilla e León e Norte de Portugal e zonas de cultivo.

| DESIGNAÇÃO ESPANHOLA | OESTE DE CASTILLA E LEÓN | DESIGNAÇÃO PORTUGUESA | NORTE DE PORTUGAL |
|------------------------------|---|---|--|
| Albillo Real (B) | Cebreros | Arvilho | - |
| Alvarinho (B) | DO Bierzo | Alvarinho | DOC Vinho Verde, DOP "Três os Montes-Chaves" |
| Paleta en Cruz (B) | DO Arribes | Rabigato | DOC Douro, IPR Planalto Mirandês, DOP "Três os Montes-Chaves", DOP "Três os Montes-Valpaços", DOP "Três os Montes-Planalto Mirandês" |
| Cagarizo (B) | DO Bierzo | Folgado | DOC Douro |
| Chancelas Doré (B) | DO Bierzo, DO Toro | Chancelas | DOC Douro |
| Doña Blanca (B) | DO Arribes, DO Bierzo, DO Tierra de León, DO Tierra del Vino de Zamora, Vino de la Tierra Valles de Benavente | Síria, Dona Branca | DOC Beira Interior, DOC Douro, DOP "Três os Montes-Chaves", IPR Valpaços, DOP "Três os Montes-Valpaços" |
| Godello (B) | DO Bierzo, DO Arribes, DO Tierra del Vino de Zamora | Gouveio, Verdeño | DOC Távora-Varosa, DOC Douro, IPR Chaves, IPR Valpaços, IPR Planalto Mirandês, DOP "Três os Montes-Valpaços", DOP "Três os Montes-Planalto Mirandês" |
| Moscatel de Grano Menudo (B) | DO Bierzo, DO Tierra del Vino de Zamora, DO Toro, Vino de la Tierra Valles de Benavente | Moscatel Galego, Moscatel de Vago Miúdo | DOC Douro, DOP "Três os Montes-Chaves", DOP "Três os Montes-Valpaços", DOP "Três os Montes-Planalto Mirandês" |
| Palomino (B) | DO Bierzo, DO Rueda | Malvasia Rei, Gervé | DOC Beira Interior, DOC Dão, DOC Douro |

Existe outro tipo de variedades brancas que se cultivam em diversas zonas da região demarcada do Douro, tanto em Castilla e León como no Norte de Portugal, mas não estão reconhecidas nos regulamentos das referidas zonas. Entre elas destaca-se a

variedade Albillo Real, cultivada na região de Cebreros (Ávila) e muito dispersa em DO Tierra del Vino de Zamora e DO Toro (Rubio *et al.* 2008), corresponde à variedade Arvilho que tem um cultivo esporádico e isolado no Norte de Portugal. Puesta en Cruz, referida por “García de los Salmones“ (1914), em Zamora, coincide com a variedade portuguesa Rabigato que é reconhecida em várias regiões com denominação de qualidade do Norte de Portugal. A variedade Chasselas Doré, cultivada nas DDOO Bierzo e Tierra de León com o nome de Malvasía (Arranz *et al.* 2009) e na DO Toro com o nome de Albillo Negro está admitida na DOC Douro, em Portugal. A variedade Cagarrizo localizada esporadicamente em DO Bierzo (González-Andrés *et al.* 2007), é uma sinonímia da variedade portuguesa Folgasão que abrangida pela DOC Douro. Finalmente, Albariño, típica da Galiza foi localizada de forma isolada na DO Bierzo é cultivada com o nome de Alvarinho na DOC Vinhos Verdes e a DOP Trás-os-Montes - Chaves.

A combinação das técnicas de marcadores moleculares com a descrição ampelográfica permitiu a identificação das variedades localizadas já que as diferentes formas de cultivo e as condições do solo e do clima induzem a mostrar que variedades aparentemente diferentes são semelhantes entre si. Diversos descritores morfológicos de algumas das variedades estão reunidos na tabela 5.

Tabela 5. Diversos descritores das variedades Bruñal/Alfrocheiro Preto Bastardillo Chico/Bastardo, Doña Blanca e Malvasía Castellana/Malvasía Rei e Puesta em Cruz/Rabigato.

| OHV | Bruñal (T) | Bast. Ch. (T) | Doña Blanca (B) | Puesta em Cruz (B) |
|-------|---|---------------|-----------------|---------------------|
| 002 | Distribuição pigma, antocianica extremidade | Limitada | Limitada | Limitada |
| 003 | Intensidade e pigmentação extremidade | Forte | Média | Forte |
| 004 | Intensidade do indumento na extremidade | Média | Média | Elevada |
| 015 | Pigmentação antocianica das gemas | Nula/M.baixa | Média | Nula ou muito fraca |
| 011 | Cor da 4ª folha | Verde | Verde | Verde |
| 013 | Densidade do indumento entre os nervos | Média | Média | Elevada |
| 067 | Forma do limbo da folha adulta | Orbicular | Orbicular | Pentagonal |
| 076 | Forma dos dentes folha adulta | Convexos | Convexos | Convexos |
| 079 | Forma do seio peciolar folha adulta | Aberto | Fechado | Pouco aberto |
| 082 | Forma dos seios laterais superiores | Fechado | Fechados | Lóbulos lig. sup. |
| 083-1 | Forma base dos seios laterais superiores | Em V | Em lira | Em lira |
| 084 | Densidade do indumento entre nervos | Baixa | Média | Média |
| 202 | Tamanho do cacho | Muito pequ. | Pequeno | Médio |
| 204 | Compactidade do racimo | Compacto | Médio | Médio |
| 206 | Comprimento do pedicelo do racimo | Muito curto | Muito curto | Muito curto |
| 208 | Forma do cacho | Cilíndrico | Cilíndrico | Cônico |
| 223 | Forma do bago | Esférica | Acuminada | Esférica |
| 225 | Cor da película do bago | Azul-escuro | Azul - escuro | Verde - amarela |
| 501 | Peso de um bago | Muito baixo | Baixo | Baixo |

4. CONCLUSÕES

Foi estudado e caracterizado o conjunto de variedades existentes em várias regiões vitivinícolas tanto do Oeste de Castilla e León como do Norte de Portugal. Existe um grupo destacado de 5 variedades tintas e 4 brancas que são cultivadas em regiões com denominação de qualidade, que são apreciadas e reconhecidas em ambos os países.

Existe outro grupo que se resume a 7 variedades tintas e 5 variedades brancas que são cultivadas em inúmeras regiões, já referidas, que são também semelhantes entre si, estão reconhecidas e protegidas em regiões com denominação de qualidade em Portugal, mas não em Espanha, sendo o seu cultivo disperso, o que pode indicar uma migração de determinadas variedades de umas zonas vitivinícolas para outras no âmbito geográfico do Noroeste da Península Ibérica.

AGRADECIMENTOS: O trabalho foi possível através do financiamento INIA (RTA 2005-00200-00), FEDER e de Junta de Castilla e León e da colaboração do Grupo de Viticultura do ITACyl.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, A. AIRES, C. ALMEIDA 2005. Agronomic behavior of grapevine Fernao Pires on three rootstocks, at demarcated region of Bairrada, Portugal. GESCO Proceedings. Geisenheim: 134-139.
- ARRANZ, C., RUBIO, J.A., ORTIZ, J.M., MARTÍN, J.P., YUSTE, J. 2009. La variedad Malvasía en el oeste de Castilla y León. *Vida Rural* 285:44-48.
- ARRANZ, C., YUSTE, J., HIDALGO, E., SANTANA, J.C., ORTIZ, J.M., MARTÍN, J.P., ALBURQUERQUE, M^a.V., BARAJAS, E., CASTAÑO, F.J., RUBIO, J.A. 2008. Variedades de vid cultivadas en la Sierra de Francia. Importancia, identificación, sinonimias y homonimias. *La Semana Vitivinícola* 3223: 1414-1420.
- BALEIRAS-COUTO, M.; MARQUES, A.G.S.; CARNEIRO, L.C.; EIRAS-DIAS, J.F. 2007.

- Estudos de sinonímia e homonímia de variedades de *Vitis Vinifera* L. por marcadores moleculares de SSR. 7º Simpósio de vitivinicultura do Alentejo: 364-372.
- BÖHM, J., MOTA, J., EIRAS, J. E., MAGALHÃES, N., MARTINS, A., DE SEQUEIRA, O. A. 2007. Portugal vitícola, o grande livro das castas. Portugal. 229 pp.
- BOWERS, J.E., DANGL, G.S., VIGNANI, R., MEREDITH, C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628-633.
- CHOMÉ, C., SOTÉS, V., BENAYAS, F., CAYUELA, M., HERNÁNDEZ, M., CABELLO, F., ORTIZ, J., RODRÍGUEZ-TORRES, I. Y CHAVES, J. 2003. Variedades de vid. Registro de variedades comerciales. M.A.P.A. Secretaría General Técnica. Madrid, pgs. 303.
- GARCÍA DE LOS SALMONES, N. 1914. Memoria General de las Sesiones del Congreso y Ponencias Presentadas. Congreso Nacional de Viticultura. Pamplona. Imprenta Provincial J. Ezquerro.: 391-533.
- GARRIDO, B. 2002. "Terrazgo vitícola y tradición vinícola en Arribes del Duero, Asociación Vino de Calidad de Arribes". Pereña (Salamanca). España, pgs.77.
- GENRES 081 European union project. 2001. Primary and secondary description list for grapevine cultivars and species (*Vitis*). Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen, Germany.
- GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; MARTÍN, J.P.; YUSTE, J.; RUBIO, J.A.; ARRANZ, C., ORTIZ, J.M. 2007. Identification and molecular biodiversity of autochthonous grapevine cultivars in the "Comarca del Bierzo", León, Spain. *Vitis* 46: 71-76.
- LOPES, M.S., SEFC, K.M., EIRAS DIAS, E., STEINKELLNER, H., LAIMER DA CAMARA MACHADO, M., DA CAMARA MACHADO, A. 1999. The use of microsatellites for germplasm management in a portuguese grapevine collection. *Theor. Appl. Genet.* 99: 733-739.
- MARTIN, J.P., BORREGO, J., CABELLO, F., ORTIZ, J.M. 2003. Characterization of Spanish grapevine cultivar Diversity using sequence-tagged microsatellite site markers. *Genome* 46: 1-3.
- MARTIN, J.P., SANTIAGO, J.L., PINTO-CARNIDE, O., LEAL, F., MARTINEZ, M.C., ORTIZ, J.M. 2006. Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula using microsatellite markers. *Gen. Res. Crop Evol.* 53: 1255-1261.

- O.I.V. 1984. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de *Vitis*. A. Dedon. Paris. 190 pp.
- ORTIZ, J.M., MARTÍN, J.P., BORREGO, J., CHÁVEZ, J., RODRÍGUEZ, I., MUÑOZ, G., CABELLO, F. 2004. Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 403-409.
- RODRÍGUEZ-TORRES, I., CHÁVEZ, J., ORTIZ, J.M., CABELLO, F. 2000. Avance sobre la resolución de sinonimias y homonimias de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) autorizadas en las diferentes Denominaciones de Origen (D.O.) españolas. *La Semana Vitivinícola* 2815/16, pgs. 2677-2686.
- RUBIO, J.A., YUSTE, R., ALBURQUERQUE, M.V., ARRANZ, C., YUSTE, J. 2008. El Albillo en Castilla y León: dos variedades de vid, Albillo Mayor y Albillo Real. *Cámara Agraria de Valladolid* 89:36-38.
- RUBIO, J.A., YUSTE, J., ARRANZ, C., MARTÍN, J.P., ORTIZ, J.M. 2005. Variedades autóctonas de vid de Arribes del Duero: descripción y sinonimias. *Viticultura/Enología Profesional* 99: 5-17.
- SANTANA, J.C., HIDALGO, E., DE LUCAS, A.I., RECIO, P., ORTIZ, J.M., MARTÍN, J.P., YUSTE, J., ARRANZ, C., RUBIO, J.A. 2008. Identification and relationships of accessions grown in the grapevine Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. *Gent. Res. Crop. Evolution* 55: 573-583.
- SEFC, K.M., LOPES, M.S., LEFORT, F., BOTTA, R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., IBAÑEZ, J., PEJIC, WAGNER, H.W., GLÖSSL, J., STEINKELLNER, H. 2000. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the Geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100: 498-505.
- SEFC, K., REGNER, F., TURETSCHKE, E., GLÖSSL, J., STEINKELLNER, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42: 367-373.
- THOMAS, M.R., SCOTT, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Gen.* 86: 985-990.
- YUSTE, J., MARTÍN, J.P., RUBIO, J.A., HIDALGO, E., RECIO, P., SANTANA J.C., ARRANZ, C., ORTIZ, J.M. 2006. Identification of autochthonous grapevine varieties in the germplasm collection at the ITA of “Castilla y León” in Zamadueñas, Valladolid, Spain. *Spanish J. Agric. Res.* 4 (1): 31-36.



A RIQUEZA DESCONHECIDA DAS POPULAÇÕES DE VINHA SELVAGEM (*VITIS VINIFERA* L. SUBSP. *SYLVESTRIS*) DO ALENTEJO

Jorge CUNHA¹; Margarida TEIXEIRA-SANTOS²; Pedro FEVEREIRO^{3,4}; José Eduardo EIRAS-DIAS¹

RESUMO

No final do século XX e na 1ª década do XXI, foram localizadas 12 populações de vinha selvagem (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) no Sul de Portugal. Onze dessas populações estão circunscritas ao Alentejo e vivem em *habitats* ripícolas das bacias hidrográficas do Tejo, Sado e Guadiana. Quatro das populações localizadas têm sido objecto de intenso estudo, incluindo a caracterização fitossociológica do *habitat*, a caracterização ampelográfica com descritores morfológicos e genotipagem com 6 microssatélites nucleares, determinação da linhagem materna com 4 microssatélites cloroplastidiais, observações do estado sanitário incluindo infecção com vírus e relações com a origem das castas portuguesas. Caracterizaram-se 53 genótipos diferentes. As populações apresentam grande diversidade genética e contêm alelos raros. Os genótipos estudados pertencem a duas linhagens maternas, uma ancestral da espécie (33%) e outra típica da Península Ibérica (66%). Esta subespécie encontra-se na lista do ICUN, mas em Portugal não tem nenhuma protecção específica pelo que a perda deste património terá graves consequências, visto que é um importante repositório de variabilidade e como tal uma fonte de genes potencialmente úteis para a viticultura e enologia.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, microssatélites, genotipagem, alelos raros

¹ INRB, INIA-Dois Portos, Quinta da Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Portugal;

² INRB, INIA-Oeiras, Quinta do Marquês 2784-505 Oeiras, Portugal;

³ Fac. Ciências, Dep. Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal;

⁴ ITQB, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Apartado 127, 2781-901 Oeiras, Portugal.

1. INTRODUÇÃO

No final do século XX e na primeira década do XXI foram localizadas 12 populações de videira selvagem (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*), no Sul de Portugal, o que constitui a localização mais ocidental da área de distribuição desta subespécie. Onze dessas populações estão circunscritas ao Alentejo e vivem em *habitats* ripícolas e coluviais de três bacias hidrográficas Tejo, Sado e Guadiana. A subespécie cultivada é, maioritariamente, monóica com flores hermafroditas, mas a *sylvestris* é por sua vez, maioritariamente, dióica, como outras espécies do género *Vitis*, existindo plantas com flores femininas de pistilos desenvolvidos, mas com os filetes curtos, reflexos e anteras com pólen inviável, e plantas com flores masculinas de pistilos rudimentares, mas com filetes erectos e anteras com pólen viável. As duas subespécies de *Vitis vinifera* distinguem-se de outras espécies do género *Vitis* e de híbridos por terem a extremidade do ramo jovem aberta. Quatro das populações localizadas, três delas alentejanas, têm sido objecto de intenso estudo. A caracterização fitossociológica do *habitat* mostrou que as populações estão confinadas a estreitas faixas ribeirinhas e, sendo lianas, têm como tutores principais: salgueiros, amieiros, freixos, carvalhos e sobreiros. Cada população tem entre cinco e cinquenta plantas com uma razão entre o número de plantas femininas e masculinas muito variável (CUNHA *et al.* 2004). A descrição ampelográfica, baseada nos descritores morfológicos da OIV, revelou características específicas como cachos muito pequenos (100g), bagos tintos com altos teores de acidez e grainhas com a razão largura /comprimento sempre superior a 0,75 (CUNHA *et al.* 2007). A composição dos mostos apresenta um teor variável de açúcar e uma acidez elevada (CUNHA *et al.* 2007). A determinação das linhagens maternas baseada em quatro microssatélites cloroplastidiais, revelou duas linhagens, uma ancestral da espécie e outra típica da Península Ibérica (ARROYO-GARCIA *et al.* 2006), sendo 33% das plantas *sylvestris* analisadas pertencentes ao grupo ancestral e 66% pertencentes ao grupo Ibérico (CUNHA *et al.* 2009).

O diagnóstico dos vírus mais nefastos para as castas tradicionais, revelou que a sua ausência nas plantas da população de Alcácer do Sal, quer um baixo nível de infecção nas plantas das outras populações (SANTOS *et al.* 2003). São também de baixo nível os ataques observados de doenças criptogâmicas, mesmo em condições consideradas favoráveis quer ao míldio, quer ao oídio. Esta situação mantém-se numa pequena colecção *ex situ* (35 entradas e 5 plantas por entrada, enxertadas em R110), na Quinta do

Provedor pertencente ao INRB, IP/INIA, em Dois Portos, mesmo na ausência de tratamentos.

Com este trabalho, pretende-se incrementar o conhecimento sobre as videiras selvagens portuguesas, utilizando os seis microssatélites recomendados pela OIV, à semelhança dos trabalhos realizados com as castas, alertando assim para a necessidade da sua preservação não só do ponto de vista histórico como também genético. O número considerável de alelos raros (alelos presentes em menos de 5% das plantas) encontrados nestas plantas pode estar associado a características fenotípicas, como baixas incidências virais e de doenças criptogâmicas. A *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* encontra-se na lista do ICUN (International Union for Conservation of Nature), mas em Portugal não tem nenhuma protecção específica. A perda deste património genético, maioritariamente alentejano, terá graves consequências, pois é um importante repositório de variabilidade e como tal é uma fonte potencial de genes úteis para a viticultura e enologia actuais e vindouras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram colhidas folhas jovens de sessenta plantas de *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi com base na dissimelhança fenotípica em quatro populações. As populações em estudo encontram-se nos concelhos de Montemor-o-Novo (população 01), Castelo Branco (população 02), Alcácer do Sal (população 04) e Portel (população 05), como descrito em CUNHA (2009). Na Figura 1 estão marcadas todas as populações localizadas por este grupo de trabalho, estudadas ou não.

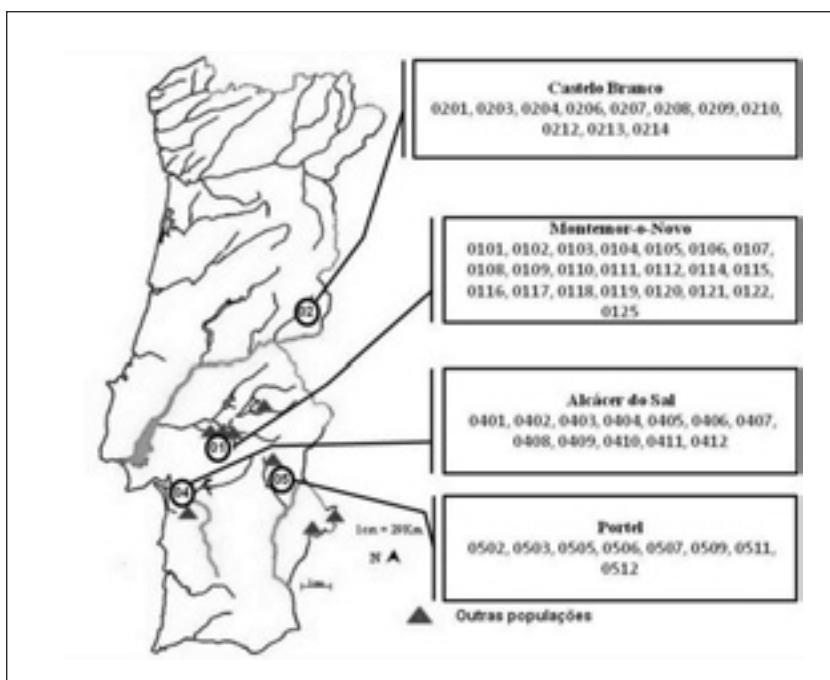


Figura 1 – Localização das populações de videira *sylvestris* em Portugal. Identificação das plantas em estudo, em cada uma das populações 01, 02, 04, 05.

2.2. Genotipagem com microssatélites nucleares

O DNA total foi extraído e isolado de folhas jovens, segundo ALMADANIM *et al.* (2007), e amplificado, utilizando seis pares de iniciadores que flanqueiam as sequências dos SSR nucleares, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62, VrZag79 e VVS2, sugeridos pela OIV para a caracterização do género *Vitis*. As condições de reacções em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas segundo CUNHA (2009). O tamanho dos fragmentos foi determinado através de electroforése capilar num CEQ 8000, Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

2.3. Análise matemática

O programa MICROSAT (MINCH *et al.* 1997) foi utilizado para excluir genótipos

nucleares idênticos (BOWCOCK *et al.* 1994). Em todos os cálculos, quando apenas um único alelo foi detectado por *locus*, as amostras foram consideradas homozigóticas em vez de heterozigóticas com um alelo nulo quando apenas um único alelo foi detectado por *locus*. Para calcular o número médio de alelos por *locus* (N_a), a heterozigocidade observada (H_o), a heterozigocidade esperada (H_e) e o conteúdo informativo do polimorfismo (PIC) para cada *locus* de microssatélites utilizou-se o programa PowerMarker v3.23 (LIU 2002). Este programa foi também usado para determinar o número médio de alelos e o coeficiente de endogamia (f) em cada população e para todos os *loci*. A riqueza alélica (N_r) foi calculada através do FSTAT v2.9.3.2 (GOUDET 1995). O GenAlex6 (PEAKALL e SMOUSE 2006) foi utilizado para avaliar o número de alelos particulares (N_{pr}), calcular a variância molecular (AMOVA) e determinar a distribuição hierárquica da variância genética dentro e entre as populações. A estatística F foi testada não parametricamente com 1000 permutas. Utilizou-se ainda o programa GENEPOP v3.4 (RAYMOND e ROUSSET 1995) para testar as frequências genotípicas segundo as expectativas de Hardy-Weinberg (HW), para testar o desequilíbrio de ligação dos *loci* e para estimar a significância da diferença genotípica entre cada par de populações. Todos os testes de probabilidade foram baseados no método em cadeia de Markov (GUO e THOMPSON 1992, RAYMOND e ROUSSET 1995), utilizando 10000 passos de memorização, 100 lotes e 5000 iterações por lote.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das sessenta plantas inicialmente escolhidas, atendendo apenas à diversidade encontrada no fenótipo, sete revelaram-se ser idênticas genotipicamente. Estas sete plantas pertenciam na sua maioria à população de Portel que tem como tutor principal plantas do género *Rubus* (silvas), o que dificulta a observação morfológica e, ao mesmo tempo, ao ser mais frequentemente sujeita a limpeza favorece a multiplicação por estaca de genótipos pré-existentes.

As plantas estudadas apresentaram cinquenta e três alelos nos seis *loci* nucleares analisados, o que corrobora a variabilidade morfológica encontrada em trabalhos anteriores (CUNHA *et al.* 2007). O número de alelos variou entre sete (VRZag 62) e onze (VVS2) com um valor médio de 8,8 alelos por *locus* (Quadro 1). Para todos os *loci* a

variação alélica é superior a dois nucleótidos, apenas o *locus* VVS2 tem uma variação nucleotídica de 2 bases. Os valores da heterozigocidade observada por *locus* variaram entre $H_o=0,509$ e $H_o=0,736$, com um valor médio de 0,601. A heterozigocidade esperada apresentou valores semelhantes à heterozigocidade observada, variando entre $H_e=0,588$ e $H_e=0,801$, com um valor médio de 0,676. Todos os *loci* dos microssatélites nucleares são polimórficos, como previsto, apresentando valores de PIC entre 0,569 e 0,778.

Quadro 1 – *Loci*, seqüências nucleotídicas repetitivas, tamanhos dos fragmentos, número de amostras (*n*), número de alelos (*Na*), heterozigocidade observada (*Ho*), heterozigocidade esperada (*He*) e conteúdo informativo do polimorfismo (*PIC*) para os seis microssatélites nucleares analisados

| <i>Locus</i> | Seqüência nucleotídica repetitiva | Tamanho dos fragmentos | <i>subsp. sylvestris</i> | | | | |
|--------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | | | <i>n</i> | <i>Na</i> | <i>Ho</i> | <i>He</i> | <i>PIC</i> |
| VVMD5 | (CT)3TA(CT)11ATAG(AT)3 | 222-268 | 53 | 10 | 0,585 | 0,588 | 0,569 |
| VVMD7 | (CT)14,5 | 231-265 | 53 | 9 | 0,547 | 0,651 | 0,621 |
| VVMD27 | (CT) <i>n</i> | 171-219 | 53 | 8 | 0,509 | 0,707 | 0,677 |
| VRZag62 | (AG)9 | 174-220 | 53 | 7 | 0,585 | 0,657 | 0,594 |
| VRZag79 | (GA)19 (entre 185-203) | 235/236-261/262 | 53 | 8 | 0,642 | 0,653 | 0,623 |
| VVS2 | (GA)19 (entre 236-260) | 123/124-161/162 | 53 | 11 | 0,736 | 0,801 | 0,778 |
| Média | | | | 8,8 | 0,601 | 0,676 | 0,644 |
| Mínimo | | | | 7,0 | 0,509 | 0,588 | 0,569 |
| Máximo | | | | 11,0 | 0,736 | 0,801 | 0,778 |

O número total de alelos encontrado nos microssatélites nucleares por população variou entre 24 para a população 04 e 38 para a população 01 (Quadro 2). O número médio de alelos por *locus* e por população variou entre 4,0 para a população 04 e 6,3 para a população 01. A riqueza alélica (número de alelos por *locus* independente do tamanho da amostra) variou entre 3,5 para a população 04 e 4,8 para a população 01. O número de alelos raros (alelos presentes em menos de 5% das amostras de uma população) apresenta uma situação divergente, variando de zero na população 05 a 13 na população 01.

Há um pequeno número de alelos particulares em cada uma das populações *sylvestris* (um ou dois). A heterozigocidade observada por população variou entre $H_o = 0,545$ (população 02) e $H_o = 0,729$ (população 05) e a heterozigocidade esperada por população variou entre $H_e = 0,545$ (população 04) e $H_e = 0,665$ (população 01).

Um desvio significativo do equilíbrio HW foi encontrado no *locus* VVMD27 nas populações 02 e 04; nos *loci* VVMD5 e VVS2 na população 01, e no *locus* VVS2 na população 01 (Quadro 3 - a negrito). O equilíbrio HW observado na maioria dos *loci* e na maioria das populações indica que existe uma diversidade elevada no interior das populações *sylvestris*. Este elevado nível de diversidade alélica nessas populações está provavelmente relacionado com o sistema de reprodução, maioritariamente, por semente e resultante de polinização cruzada.

Quadro 2 – Variabilidade genética estimada baseada em seis microssatélites nucleares de quatro populações portuguesas de plantas *sylvestris*

| N° | População | <i>n</i> | <i>Nat</i> | <i>Nr</i> | <i>Nal</i> | <i>Npr</i> | <i>Nar</i> | <i>Ho</i> | <i>He</i> |
|----|-----------------|----------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 01 | Montemor-o-Novo | 22 | 38 | 13 | 6,3 | 2 | 4,8 | 0,598 | 0,665 |
| 02 | Castelo Branco | 11 | 25 | 7 | 4,2 | 1 | 3,8 | 0,545 | 0,596 |
| 04 | Alcácer do Sal | 12 | 24 | 8 | 4,0 | 2 | 3,5 | 0,569 | 0,545 |
| 05 | Portel | 8 | 26 | 0 | 4,3 | 2 | 4,3 | 0,729 | 0,660 |

n, n° de amostras por população; *Nat*, n° total de alelos por população; *Nr*, n° de alelos raros (alelos presentes em menos de 5% das amostras) por população; *Nal*, n° de alelos por *locus*; *Npr*, n° de alelos particulares por população; *Nar*, n° de alelos por *locus* independentemente do tamanho da amostra (riqueza alélica); *Ho*, heterozigocidade observada; *He*, heterozigocidade esperada.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da diversidade genética é atribuída às diferenças entre as plantas de uma mesma população (93,0%), e apenas 7% da diversidade genética é atribuída às diferenças entre populações, revelando uma baixa diferenciação entre elas. Os valores positivos do coeficiente de endogamia (*f*) em populações *sylvestris* podem ser devidos ao isolamento geográfico, de que resulta o aparecimento de genótipos homocigóticos para determinados alelos e a perda de diversidade. Os *loci* VVMD5, VVMD27 e VVS2 revelam um elevado défice de heterozigocidade nas populações 01, 02 e 04, possivelmente devido a perda de alelos.

Quadro 3 – Heterozigocidade esperada (*He*) e coeficiente de endogamia (*f*) (WEIR e COCKERHAM 1984) entre os seis microssatélites nucleares de quatro populações portuguesas de plantas *syvestris*

| N° | População | | VVMD5 | VVMD7 | VVMD27 | VRZag 62 | VRZag 79 | VVS2 |
|----|----------------------|-----------|----------------|--------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|
| 01 | Montemor-o- -Novo | <i>He</i> | 0,463 | 0,667 | 0,723 | 0,659 | 0,762 | 0,821 |
| | | <i>f</i> | 0,215 * | 0,318 | 0,120 | -0,034 | 0,045 | 0,115 ** |
| 02 | Castelo Branco | <i>He</i> | 0,591 | 0,609 | 0,554 | 0,718 | 0,510 | 0,791 |
| | | <i>f</i> | -0,077 | 0,104 | 0,672 ** | 0,240 | 0,107 | -0,149 * |
| 04 | Alcácer do Sal | <i>He</i> | 0,538 | 0,436 | 0,723 | 0,489 | 0,565 | 0,659 |
| | | <i>f</i> | -0,239 | -0,148 | 0,539 ** | -0,023 | -0,329 | -0,011 |
| 05 | Ponteil | <i>He</i> | 0,759 | 0,679 | 0,795 | 0,643 | 0,545 | 0,795 |
| | | <i>f</i> | -0,318 | -0,289 | -0,101 | 0,222 | 0,082 | 0,213 |

Desvios significativos do equilíbrio Hardy-Weinberg: ** - nível de significância a 1%; * - nível de significância a 5%; os valores não marcados não são significativos.

Para otimizar a exploração da diversidade natural das plantas *syvestris* é importante identificar os alelos raros, permitindo o estabelecimento de colecções nucleares e estudar a evolução genética dessa subespécie, tal como sugerem LE CUNFF *et al.* (2008) para as castas cultivadas. A baixa riqueza alélica observada nas populações de plantas *syvestris* 02 e 04 alerta para um potencial estrangulamento genético, presumivelmente associado à pressão humana, assim como à catastrófica propagação de agentes patogénicos oriundos da América do Norte durante os últimos 150 anos (filoxera, míldio e oídio). A riqueza alélica, sendo mais influenciada pelos alelos raros do que pela heterozigocidade esperada, é geralmente considerada um dos critérios mais relevantes para medir a perda de diversidade devido a estrangulamentos genéticos (EL MOUSADIK e PETIT 1996).

4. CONCLUSÕES

As populações de plantas *syvestris* portuguesas apresentam uma elevada diversidade intra populacional, com grande parte da diversidade genética conservada dentro de cada população, e uma baixa, mas significativa, diversidade genética entre populações. As populações de plantas *syvestris* parecem formar um contínuo e não há uma clara divisão entre populações. A variabilidade existente nas populações *syvestris* não levanta uma preocupação imediata sobre estrangulamentos demográficos, uma vez que existem em número razoável alelos raros. O domínio privado das propriedades onde as

populações vegetam e a falta de leis específicas para as proteger em Portugal são uma potencial ameaça à manutenção da variabilidade. Este estudo contribuiu para determinar a variabilidade existente nas plantas *sylvestris*. Forneceu, também, uma base para a monitorização futura da perda de diversidade genética e contribuiu com dados para estabelecer uma colecção nuclear com vista a preservar a variabilidade existente. A manutenção da riqueza alélica deve ser prioritária em programas de melhoramento, uma vez que características interessantes estão ligadas a alelos raros (EL MOUSADIK e PETIT 1996).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pela FCT – PARIPIPI -Projecto A de Portugal e pelos projectos europeus GrapeGen06 e Grasp Grape Wine. Jorge Cunha foi financiado através de uma bolsa de Doutoramento da FCT (SFRH/ BD/16226/2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADANIM M.C., BALEIRAS-COUTO M.M., PEREIRA H.S., CARNEIRO L.C., FEVEIREIRO P., EIRAS-DIAS J.E., MORAIS L., VIEGAS W., VELOSO M.M. (2007) Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties most utilized for wine production in Portugal. *Vitis*. 46:111–116.
- ARROYO-GARCÍA R., RUIZ-GARCIA L., BOLLING L., OCETE R., LOPEZ M.A., ARNOLD C., ERGULA A., SOEYLEMEZOGLU G., UZUN H.I., CABELLO F., IBANEZ J., ARADHYA M.K., ATANASSOV A., ATANASSOV I., BALINT S., CENIS J.L., COSTANTINI L., GORISLAVETS S., GRANDO M.S., KLEIN B.Y., MCGOVERN P.E., MERDINOGLU D., PEJIC I., PELSY F., PRIMIKIRIOS N., RISOVANNAYA V., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A., SNOUSSI H., SOTIRI P., TAMHANKAR S., THIS P., TROSHIN L., MALPICA J.M., LEFORT F., MARTINEZ-ZAPATER J.M. (2006) Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol. Ecol.* 15:3707–3714.
- BOWCOCK A.M., RUIZ-LINARES A., TOMFOHRDE J., MINCH E., KIDD J.R., CAVALLISFORZA L.L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368:455–457.

- CUNHA J. (2009) Diversidade biológica de *Vitis vinifera* L. em Portugal: contribuição genética da subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi para a origem das castas Portuguesas, subsp. *vinifera*. Tese de Doutoramento, Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, Oeiras.
- CUNHA J., TEIXEIRA SANTOS M., CARNEIRO L.C., FEVEREIRO P., EIRAS-DIAS J.E. (2009) Portuguese traditional grapevine cultivars and wild vines (*Vitis vinifera* L.) share morphological and genetic traits. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 56:975–989.
- CUNHA J., BALEIRAS-COUTO M., CUNHA J.P., BANZA J., SOVERAL A., CARNEIRO L.C., EIRAS-DIAS J.E. (2007) Characterization of Portuguese populations of *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54:981–988.
- CUNHA J., CUNHA J.P., LOUSÃ M., EIRAS-DIAS J.E. (2004) Os bosques ribeirinhos, fonte de diversidade genética de *Vitis vinifera* L.. *Cienc. e Tec. Vitiv.* 19:51–59.
- EL MOUSADIK A., PETIT R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argon tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92:832–839.
- GOUDET J. (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity.* 86:485–486.
- GUO S.W., THOMPSON E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 48:361–372.
- LE CUNFF L., FOURNIER-LEVEL A., LAUCOU V., VEZZULLI S., LACOMBE T., ADAM-BLONDON A.F., BOURSQUOT J.M., THIS P. (2008) Construction of nested genetic core collections to optimize the exploitation of natural diversity in *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa*. *BMC Plant Biology.* 8:31.
- LIU J. (2002) POWERMARKER – A powerful software for marker data analysis. Raleigh, NC: North Carolina State University, Bioinformatics Research Center (<http://www.powermarker.net>).
- MINCH E., RUIZ-LINARES A., GOLDSTEIN D., FELDMAN M., CAVALLI-SFORZA L.L. (1997) MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford, CA: Stanford University, available at: <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat>.

- PEAKALL R., SMOUSE P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 6:288–295.
- RAYMOND M., ROUSSET F. (1995) GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248–249.
- SANTOS M.T., CUNHA J., EIRAS-DIAS J.E.J., SANTOS C., NOLASCO G. (2003) Detection of Grapevine Viruses by RT-PCR from DS-RNA Templates in three Natural Occuring Portuguese Populations of *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmelin Hegi). In: Extended Abstracts of 14 th Meeting of ICGV. Locorotondo. Itália, 197-198.
- WEIR B.S., COCKERHAM C.C. (1984). Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.



AROMAS ESPECÍFICOS EM VINHOS DE VARIEDADES DE VIDEIRAS ESPANHOLAS ANTIGAS CONSERVADAS EM BANCOS DE GERMOPLASMA

¹Tatiana BUHNER ZAHARIEVA, ¹Rosa GIMÉNEZ, ²Ernesto FRANCO, ²Raquel MENÉ, ²Javier ANDREU, ²Ramón NÚÑEZ, ³Vicente FERREIRA, ¹Yolanda GOGORCENA

RESUMO

O objectivo deste estudo foi a caracterização ampelográfica e molecular de 57 castas antigas da colecção de germoplasma de videira de Aragão (Espanha), para além da avaliação do seu potencial enológico. Foram obtidos vinte e quatro perfis moleculares ou génotipos, o que constitui uma grande fonte de variação genética de interesse. Foram utilizadas algumas amostras representativas do material vegetal para este estudo enológico, com o objectivo de encontrar propriedades relacionadas com a cor, sabor e aroma dos vinhos obtidos. Foi feita uma caracterização sensorial e química e foi levada a cabo uma quantificação dos aromas mais importantes encontrados através da olfatometria e cromatografia de gases/massas. Alguns compostos encontrados têm especial importância e podem dar ao vinho aromas específicos e inovadores.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., diversidade genética, marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas), potencial enológico.

1 – INTRODUÇÃO

A vinha ocupa o quinto lugar em comparação com as superfícies ocupadas pelas principais culturas em Aragão, (Anuário Estatístico Agrário de Aragão 2006-2007). 79% desta superfície está concentrada na província de Saragoça nas suas três denominações de origem (D. O.): Cariñena, Calatayud e Campo de Borja.

¹ Dpto. de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Apartado 13034, 50080 Zaragoza.

² Centro de Transferencia Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón, Barrio de Movera s/n, 50194 Zaragoza.

³ Dpto. de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza.

A política de reestruturação da vinha imposta pela União Europeia nos últimos anos trouxe como consequência a perda de importantes zonas de cultivo, com o subsequente risco de desaparecimento de grande parte do património genético vitivinícola. Este problema foi agravado pelo arranque de vinhas antigas para replantação com algumas castas de uva permitidas nas D.O. Estima-se que podem existir à volta de 15.000 castas de uva em todo o mundo, embora apenas um número reduzido delas, tais como a Cabernet Sauvignon, Syrah e Merlot ocupam superfícies importantes devido à globalização do mercado do vinho.

Em Espanha, as principais variedades são cinco (Airén, Garnacha, Tempranillo, Bobal e Monastrell) que ocupam 67% da superfície da vinha (HIDALGO, 2002). Observa-se uma tendência similar em Aragão, onde as castas Garnacha e Tempranillo ocupam 57% da superfície da vinha e, nos últimos cinco anos, 55% das novas plantações foi destinado para Cabernet, Sauvignon, Merlot e Syrah, segundo as informações recolhidas no Registo Vitícola da Comunidade Autónoma de Aragão no ano 2009.

Actualmente, estão a ser realizados trabalhos de localização e identificação de castas minoritárias e locais em todas as zonas com tradição vitícola com o objectivo de salvaguardar a biodiversidade genética em bancos de germoplasma. Em Espanha, existem 13 colecções de videiras (CHOMÉ *et al.*, 2003), de entre elas, o Banco de Germoplasma “El Encín” (Alcalá de Henares) é o mais importante a nível nacional.

O Banco de Germoplasma de Aragão, em Movera, que foi criado em 1990 com o objectivo de conservar a diversidade vitícola da região, abriga 540 amostras, na sua maioria variedades de *Vitis vinifera*. Actualmente, parte da colecção foi duplicada em duas vinhas com sistemas de condução em taça, situadas em Cariñena e La Alfranca, onde as condições de cultivo da vinha em sequeiro são mais apropriadas para o seu desenvolvimento e para a avaliação das características morfológicas e enológicas.

As técnicas moleculares desenvolvidas na última década do século passado, baseadas na amplificação de sequências do ADN, como os micro-satélites (SSR), foram amplamente empregues para a identificação varietal da videira. Em estudos de castas europeias de videira foi recomendado um mínimo de 6 micro-satélites (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, *ssrVrZAG62* e *ssrVrZAG79*) para a criação de bases de dados para a identificação de castas de videira provenientes de colecções internacionais (THIS *et al.*, 2004).

Em Espanha, foram realizados diferentes trabalhos que contribuíram para a criação de uma ampla base de dados (<http://www.sivvem.monbyte.com/sivvem.asp>) para a caracterização genética de castas autóctones de videira (IBÁÑEZ *et al.*, 2003; MARTÍN *et al.*, 2003). O potencial dos SSR para a caracterização de diferentes colecções de videiras, em Espanha, foi demonstrado em várias publicações nos últimos anos (SANTIAGO *et al.*, 2005; FERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2007; SANTANA *et al.*, 2008).

A aplicação de diferentes técnicas químico-sensoriais permitiu distinguir os compostos aromáticos com relevância no aroma do vinho (FERREIRA *et al.*, 2002; LÓPEZ *et al.*, 2003). Este conhecimento demonstrou pela primeira vez que, inclusive no caso das castas neutras como a Garnacha, a uva é a maior fonte de aromas responsáveis pela qualidade e especificidade do vinho. De igual modo, o decurso da vinificação e estágio do vinho geraram numerosos aromas, muitos dos quais procedem de uma forma relativamente directa de precursores inodoros (glicosídicos ou não- glicosídicos) e mais recentemente foram descritos, além destes, precursores ligados à cisteína ou à glutatona (TOMINAGA *et al.*, 1998).

As castas antigas aragonesas (de cultivo abandonado), que apenas estão presentes no Banco de Germoplasma de Aragão e na sua maioria não foram cultivadas nem vinificadas utilizando a tecnologia actual, poderiam ter aromas desconhecidos e/ou características nos seus vinhos que poderiam complementar os que existem actualmente.

O objectivo geral deste trabalho foi a caracterização ampelográfica e molecular e a avaliação do potencial enológico de castas tintas antigas, resgatadas e conservadas no banco do *Centro de Transferencia Agroalimentaria del Gobierno de Aragón*, com o objectivo de proporcionar ao sector vitícola aragonês, ferramentas para aumentar a biodiversidade e tipicidade dos seus vinhos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo ampelográfico e amperométrico foi realizado utilizando 39 fichas das características descritas pela O.I.V e a UPOV. (1997) e elaborando as fichas pertinentes. Desta forma, foram recolhidos dados de algumas características agronómicas como o peso do cacho, o peso de 100 bagos, a produção de videiras e o grau alcoólico provável

Tabela 1 – Lista das 57 amostras estudadas. É indicada a nomenclatura em Movera, Cariñena e La Alfranca.

| Nº | Nome de entrada | Banco Movera | | Localização vinha* | Perfil molecular 2009 | Observações |
|----|-----------------|--------------|-------|--------------------|-----------------------|---------------|
| | | Fila | Bloco | | | |
| 1 | Desconhecido | 1 | 7 | G-18 | 21 | Mal duplicada |
| 2 | Terrabajino | 1 | 16 | J-2 | 26 | |
| 3 | Garanegra | 2 | 3 | G-2 | 27 | |
| 4 | Cadrete | 2 | 7 | ND | 24 | |
| 5 | Ambrosina | 3 | 5 | E-3 | 2 | |
| 6 | Ambrosina | 10 | 2 | E-4 | 2 | |
| 7 | Blasco | 10 | 14 | Bl.6 Fila 7 | 6 | Mesa (rosada) |
| 8 | | 11 | 9 | J-16 | 12 | |
| 9 | | 11 | 12 | J-17 | 12 | |
| 10 | Desconhecido | 11 | 13 | J-18 | 13 | |
| 11 | Monastrell | 11 | 15 | H-17 | Monastrell | Mal duplicada |
| 12 | Ambrosina | 12 | 1 | E-5 | 2 | |
| 13 | Ambrosina | 12 | 2 | Bl.18 Fila 8 | 1 | |
| 14 | Ambrosina | 12 | 3 | ND | 2 | |
| 15 | Tempranillo | 12 | 13 | ND | Tempranillo | |
| 16 | Perrel | 13 | 2 | I-6 | 1 | |
| 17 | | 14 | 2 | J-19 | 3 | |
| 18 | Mazuela | 14 | 3 | H-5 | 13 | Mal duplicada |
| 19 | | 18 | 1 | K-5 | 24 | |
| 20 | Mazuela | 18 | 2 | H-7 | Mazuela | |
| 21 | Moristel | 18 | 11 | I-2 | 23 | |
| 22 | 18-16 | 18 | 16 | K-7 | 10 | |
| 23 | Desconhecido | 19 | 1 | F-3 | 19 | |
| 24 | Graciano | 19 | 2 | G-8 | 5 | Mal duplicada |
| 25 | Desconhecido | 19 | 4 | K-9 | 3 | Mesa |
| 26 | Desconhecido | 19 | 11 | K-10 | 3 | |
| 27 | Blasco | 19 | 14 | E-16 | 9 | MD- Mesa |
| 28 | Desconhecido | 20 | 6 | K-13 | 4 | MD- Mesa |
| 29 | Cadrete | 21 | 13 | F-11 | 25 | |
| 30 | Desconhecido | 21 | 14 | K-14 | 1 | |
| 31 | Desconhecido | 22 | 2 | K-16 | 15 | Mesa |
| 32 | | 22 | 3 | Bl.11 Fila 3 | 13 | |
| 33 | Cadrete | 22 | 10 | F-12 | 1 | |
| 34 | Desconhecido | 22 | 12 | F-6 | 1 | |
| 35 | Mazuela | 23 | 4 | H-9 | Mazuela | |
| 36 | Desconhecido | 24 | 1 | M-12 | 1 | |
| 37 | | 25 | 2 | G-15 | 26 | |
| 38 | | 25 | 3 | Bl.10 Fila 5 | 26 | |
| 39 | | 25 | 6 | D-13 | 3 | |
| 40 | Graciano | 25 | 13 | Bl.7 Fila 3 | 28 | |
| 41 | Benedicto | 27 | 1 | E-11 | 17 | |
| 42 | Desconhecida | 27 | 5 | L-4 | 16 | |
| 43 | | 27 | 6 | L-5 | 26 | |
| 44 | | 28 | 6 | ND | 13 | |
| 45 | Moristel | 28 | 8 | J-13 | 18 | |
| 46 | Desconhecido | 28 | 13 | L-10 | 1 | |
| 47 | Desconhecido | 29 | 6 | L-12 | Jacquez | |
| 48 | | 29 | 9 | L-14 | 21 | |
| 49 | Desconhecido | 29 | 10 | L-15 | 1 | |
| 50 | Desconhecido | 29 | 11 | L-16 | 1 | |
| 51 | | 29 | 12 | Bl.10 Fila 6 | 5 | |

| Nº | Nome de entrada | Banco Movera | | Localização vinha* | Perfil molecular 2009 | Observações |
|----|-----------------|--------------|-------|--------------------|-----------------------|-------------|
| | | Fila | Bloco | | | |
| 52 | 7.1Desconhecido | 30 | 1 | L-18 | 1 | |
| 53 | | 30 | 13 | M-3 | 20 | |
| 54 | 3.1 | 31 | 4 | M-6 | 24 | |
| 55 | Parraleta? | 31 | 5 | M-7 | 5 | |
| 56 | Parraleta? | 31 | 6 | M-8 | 5 | |
| 57 | Macho | 31 | 15 | Bl.14 Fila 8 | 7 | |

* Nome da parcela em Cariñena ou fila e bloco em La Alfranca. ND: Não duplicado; MD: Mal duplicado.

Foram recolhidas folhas de 57 amostras de videiras desconhecidas da colecção (Tabela 1), na sua maioria nas novas localizações da colecção: 46 amostras de Cariñena, 7 amostras da colecção de La Alfranca e as 4 restantes de Movera. No ano seguinte, foram recolhidas amostras da colecção de Movera e apresentaram-se diferenças no perfil molecular das duplicadas na vinha de Cariñena para descartar erros na duplicação nas vinhas correspondentes. O ADN das folhas foi extraído com o kit de *Qiagen* seguindo as recomendações do fabricante e foi determinada a concentração de ADN com *GeneQuant*.

O ADN foi ampliado com os 9 micro-satélites previamente caracterizados: VVS2, VVMD5, VVMD7, *ssrVrZAG21*, *ssrVrZAG47*, *ssrVrZAG62*, *ssrVrZAG64*, *ssrVrZAG79* e *ssrVrZAG83*. Foram realizados dois PCR múltiplos, set A e set B, seguindo o protocolo descrito em MOUSSAOUI (2005) com ligeiras modificações. Os marcadores *ssrVrZAG21*, *ssrVrZAG64* e *ssrVrZAG83* foram amplificados e analisados em separado. Os resultados das amplificações foram separados por electroforese capilar em sequenciador automático ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems). A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneScan (PE Applied Biosystems) com GeneScan-500 TAMRA como padrão interno.

Para avaliação do potencial enológico no ano 2007, foi feita a vindima de 2 amostras do Banco de Germoplasma de Movera duplicados na vinha de Cariñena. Em 2008, repetiu-se a vindima em Cariñena em 7 das amostras (E3, E5, F11, G8, H5, K14 y L16), foram vindimadas outras 3 novas (E4, F12, L15) e as outras 23 amostras foram vindimados na vinha do Banco de Germoplasma de Movera. Em 2009, foi feita a vindima parcial com o objectivo de repetir principalmente as análises de aroma. Na vindima também foram recolhidos dados da colheita, assim como o grau alcoólico do mosto.

Foram feitos testes padrão de micro-vinificação para encontrar as castas com maior capacidade para produzir vinhos de características sensoriais que se evidenciam quanto às suas propriedades de cor, sabor e aroma. A caracterização química e sensorial completa dos vinhos das variedades seleccionadas, incluiu o estudo dos seus perfis aromáticos (aplicando técnicas de Cromatografia Gasosa-Olfatometria), a identificação e quantificação dos seus aromas mais relevantes (aplicando diversas técnicas qualitativas e quantitativas de CG-EM – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa), dos seus componentes fenólicos e o estudo sensorial descritivo quantitativo dos mesmos. A caracterização do potencial aromático das uvas das castas seleccionadas foi realizada mediante o estudo dos aromas procedentes dos seus precursores específicos.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 57 amostras de videira foram genotipadas com 9 loci de micro-satélites, obtendo-se um total de 24 genótipos diferentes. As análises demonstraram que seis amostras (1.7, 11.15, 14.3, 19.2, 19.14, e 20.6) tinham perfis diferentes em ambas as localizações (Movera ou Cariñena) em mais de três SSR, pelo que se conclui que não se duplicaram correctamente enquanto estavam na vinha de Cariñena (Tabela 1). Por outro lado, as buscas nas bases de dados moleculares foram repetidas para encontrar novas correspondências dos novos perfis com variedades conhecidas e em 5 das 57 amostras iniciais (11.15, 12.13, 18.2, 23.4 y 29.6) descobriu-se que correspondiam às variedades conhecidas Monastrell, Tempranillo, Mazuela e Jacquez (Tabela 1). No entanto, não foi encontrada correspondência para o resto das amostras com os resultados obtidos com os 6 SSR mais utilizados em estudos moleculares e incluídos geralmente nas bases de dados (VVS2, VVMD5, VVMD7, *ssrVrZAG47*, *ssrVrZAG62* e *ssrVrZAG79*). Foram analisados os 3 novos marcadores (*ssrVrZAG21*, *ssrVrZAG64* e *ssrVrZAG83*), mas, como era de esperar, o resultado foi o mesmo, não se encontrou nenhuma correspondência com as castas conhecidas. Não é de excluir que algumas das amostras nas quais não temos encontrado até ao momento correspondência com castas conhecidas, conforme se vão ampliando as bases de dados nacionais e internacionais, poderiam corresponder às castas minoritárias que até agora não estão nas listas de conhecidas ou podem ser híbridas de castas conhecidas.

No geral, a analítica básica do vinho nas amostras estudadas foi correcta (Tabela 2). É de salientar que a degradação maloláctica em 2007 foi produzida na quase totalidade dos vinhos, enquanto no ano 2008 foram na sua maioria problemáticas como consequência de uma vindima “difícil” pelo que nas conclusões finais se dá um peso superior aos dados obtidos no ano de 2007.

Na classificação preliminar, salientam-se cinco amostras como interessantes com base na sua analítica básica, E-11, F-11, J-13, K-10 e L-18 (Tabela 2). Destas cinco amostras, as três últimas são interessantes pelo seu grau alcoólico moderado. É importante salientar nesta secção que o cruzamento E-11 (Benedicto) e os F-12, K14, L16 e L18 (com perfil molecular 1: Cadrete-Parrell), e o F11 (Cadrete) correspondem às castas recolhidas nas vinhas antigas de Aragão que provavelmente estão muito bem adaptadas às nossas condições de cultivo.

Estes resultados são complementados com as anotações feitas durante a degustação de vinhos de 2007 (Tabela 3). O carácter *bordelais* que se observa em alguns vinhos é interessante. Os cruzamentos E-11 (Benedicto) e o K-10 (Desconhecido) apresentam para além de uma analítica interessante também um carácter organoléptico interessante.

Tabela 2- Características diferenciais da analítica básica das amostras estudadas em 2007. A nomenclatura corresponde ao nome da parcela localizada na vinha de Cariñena.

| GRAU BAIXO | L FOLIN ALTO | COR ALTA | ESTRUTURA TÂNICA | ADAPTAÇÃO ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS COM ESTRUTURA TÂNICA |
|------------|--------------|----------|------------------|--|
| | E-11 | E-11 | E-11 | |
| E-16 | | E-16 | | |
| | F-11 | F-11 | F-11 | |
| | F-13 | F-13 | | |
| | | G-2 | | |
| J-13 | J-13 | J-13 | | J-13 |
| J-16 | | | | |
| | | K-7 | | |
| K-10 | K-10 | K-10 | | K-10 |
| | K-14 | K-14 | | |
| | | L-4 | | |
| L-16 | L-16 | L-16 | | |
| L-18 | L-18 | L-18 | | L-18 |
| M-3 | | M-3 | | |
| | M-7 | M-7 | | |

Tabela 3 – Resumo da caracterização organoléptica na degustação de 2007.

| CARÁCTER BORDELAIS | TINTO | METÁLICO | ESPECIARIAS | OUTROS |
|--------------------|-------|----------|-------------|--------------|
| | | E-5 | | |
| | E-11 | | E-11 | E-11 regaliz |
| | | | | |
| | | K-7 | | |
| | | | K-10 | |
| K-14 | | | | |
| | L-5 | L-5 | L-5 | L-5 borracha |
| L-8 | L-8 | L-8 | | |
| L-16 | L-16 | L-16 | | L-16 floral |
| | M-7 | | M-7 | |

Os dados de aromas para as amostras do ano de 2007 situam-se em todos os casos dentro dos níveis de concentração habituais nos vinhos de mesa. Há, no entanto, alguns componentes que vale a pena salientar por se encontrarem na parte mais alta da classificação de concentrações esperada para um vinho tinto. O perfil aromático da amostra L5 do ano de 2007 destaca-se quer pelos altos conteúdos terpénicos, de cinamato de etilo, de α e β -iononas e de acetato de isoamilo, como também pelo baixo teor em etilfenóis varietais e o alto teor em vinilfenol. Esta especialidade aromática sugere um vinho de aroma doce e balsâmico e desde logo constitui um perfil aromático de grande interesse.

O resultado é coerente com as observações derivadas da análise sensorial. A amostra L5 pode considerar-se, portanto, um espécime muito especial, capaz de dar aromas totalmente diferentes e não esperados num tinto. As amostras G2 e L18 apresentam como particularidades elevados teores de isoésteres (isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato de etilo) e de hidroximetilfurfural e siringaldeído, o que sugere uma alta intensidade de aroma frutado e inclusive floral, também em concordância com as observações derivadas da análise sensorial.

A amostra J18 destaca-se pelos altos teores de guaiacol, t-isoeugenol, vanilato de etilo, furfural e 5-hidroximetilfurfural, acetoína, 3-hidroxibutirato de etilo e g-butirolactona. Assim, esta amostra evidencia-se pelos seus aromas a tostado.

Os resultados apresentados sobre a caracterização analítica de aromas embora sejam preliminares, são muito prometedores e ajudaram a conseguir o objectivo geral

do estudo: proporcionar ao sector vitícola aragonês aromas distintos, que possam incorporar-se na elaboração dos nossos vinhos, usando ecótipos antigos e que possam acrescentar um elevado valor adicional ao produto. Para confirmar os resultados aromáticos obtidos sugere-se a repetição da vindima dos cruzamentos durante dois anos consecutivos e nas mesmas condições.

BIBLIOGRAFIA

- Chomé, P., Sotés, V, Benayas, F., Cayuela, M., Hernández, M., Cabello, F., Ortiz, J., Rodríguez, I., y J. Chaves. 2003. Variedades de Vid. Registro de Variedades Comerciales. MAPA, Madrid.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., and J. Cacho, 2002. Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J. Agric. Food Chem.* 50:4048-4054.
- Fernandez-Gonzalez, M., Mena, A., Izquierdo, P., and J. Martínez. 2007. Genetic characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Castilla La Mancha (Spain) using microsatellite markers. *Vitis* 46:126-130.
- Hidalgo, L. 2002. Tratado de Viticultura. 3ª Edición. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Ibáñez, J., De Andrés, M. T., Molina, A., and J. Borrego. 2003. Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 54:22-30.
- IPGRI, UPOV, OIV. 1997. Descriptores para la vid (*Vitis* spp.) Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Gêneve, Switzerland; Oficina Internacional de la Viña y del Vino, Paris, France; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- López, R., Ortín, N., Pérez-Trujillo, J.P., Cacho, J., and V. Ferreira. 2003. Impact Odorants of Different Young White Wines from the Canary Islands. *J. Agric. Food Chem.* 51:3419-3425.
- Martín, J. P., Borrego, J., Cabello, F., and J. M. Ortiz, 2003. Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers. *Genome* 46:10-18.
- Moussaoui, S. 2005. Molecular characterization of grapevine cultivars from Aragón gene bank

(Spain) using sequence-tagged microsatellite site markers. Master of Science Thesis. IAMZ, Spain.

Santana, J.C., E. Hidalgo, A.I. de Lucas, P. Recio, J.M. Ortiz, J.P. Martín, J. Yuste, C. Arranz, and J.A. Rubio. 2008. Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y Leon (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55:573-583.

Santiago, J.L., Boso, S., Martín, J.P., Ortiz, J.M., and M.C. Martínez. 2005. Characterization and identification of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from northwestern Spain using microsatellite markers and ampelometric methods. *Vitis* 44:67-72.

This, P., *et al.* 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 109:1448-1458.

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., and D. Dubourdieu, 1998. A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46:5215-5219.

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE ENOLÓGICO POR PERFIS DE RESTRIÇÃO DE rDNA

Filomena L. DUARTE^{1*}; Geni C. ZANOL¹; M. Filomena ALEMÃO¹; Ana S. GOMES¹; Ricardo REIZINHO¹; Andreia TEIXEIRA¹; Ana C. COSTA¹; Paulo T. RAMOS¹, M. Margarida BALEIRAS-COUTO¹

RESUMO

Com o objectivo de detectar e identificar leveduras de interesse enológico, têm sido desenvolvidos diversos métodos baseados em técnicas de biologia molecular. No laboratório de microbiologia do INIA-Dois Portos desenvolveu-se um método baseado na amplificação de rDNA e digestão por enzimas de restrição - Perfis de Restrição - para a identificação de espécies de leveduras envolvidas no processo de produção de vinho. A validade deste método na identificação de leveduras ao nível da espécie foi avaliada através do uso de estirpes certificadas provenientes de colecções de cultura, incluindo 38 estirpes tipo e estirpes identificadas por outras metodologias de referência como a sequenciação de rDNA, num total de 54 espécies. Este método foi aplicado a cerca de 727 isolados provenientes de uvas da casta Touriga Nacional, de ensaios de vinificação e de linhas de engarrafamento em adegas, permitindo a detecção de respectivamente, 16, 17 e 18 espécies diferentes. A sua fácil aplicação permite que o nosso laboratório possa prestar este serviço, se solicitado.

Palavras-chave: leveduras, identificação, perfis de restrição, vinho.

1 - INTRODUÇÃO

A interacção de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica pode interferir com o desenvolvimento da levedura de fermentação inoculada e alterar as características finais do vinho. Além disso, a presença de microrganismos contaminantes pode pôr em risco a qualidade e a segurança alimentar do vinho. Deste modo, o controlo microbiológico de todo o processo de produção de vinho – vinificação, estágio, enchimento e armazenamento – é essencial para garantir a

¹ INRB, I.P. / INIA-Dois Portos, 2565-191 Dois Portos, Portugal.

* Autor para correspondência: filomena.duarte@inrb.pt.

qualidade e a segurança alimentar do produto final (FLEET, 2003; MALFEITO-FERREIRA e LOUREIRO, 2003).

Por outro lado, o conhecimento e preservação da biodiversidade de leveduras associadas a ambiente v\u00ednicos s\u00e3o primordiais para a manuten\u00e7\u00e3o da especificidade dos vinhos portugueses. A identifica\u00e7\u00e3o deste biota, assume assim particular import\u00e2ncia.

A identifica\u00e7\u00e3o de leveduras segundo m\u00e9todos cl\u00e1ssicos baseia-se nas caracter\u00edsticas fisiol\u00f3gicas, designadamente a assimila\u00e7\u00e3o e fermenta\u00e7\u00e3o de diversos substratos, nas caracter\u00edsticas bioqu\u00edmicas e nas caracter\u00edsticas morfol\u00f3gicas. A utiliza\u00e7\u00e3o destas metodologias de identifica\u00e7\u00e3o de leveduras pelas empresas do sector alimentar, \u00e9 impratic\u00e1vel, dado serem muito trabalhosas, exigirem pessoal com alguma especializa\u00e7\u00e3o e por serem bastante morosas. No sentido de permitir a sua aplica\u00e7\u00e3o a n\u00edvel industrial, foram desenvolvidos sistemas miniaturizados, tendo por base o mesmo princ\u00edpio, os quais utilizam *kits* com alv\u00e9olos com os diferentes meios, aos quais se adiciona apenas a cultura pura da levedura a identificar. No entanto, a fragilidade da taxonomia de leveduras com base apenas em testes cl\u00e1ssicos tem sido posta em evid\u00eancia, nomeadamente, com o desenvolvimento dos m\u00e9todos de biologia molecular. Diversas metodologias foram desenvolvidas, algumas baseadas na totalidade do genoma, como por exemplo a reassocia\u00e7\u00e3o DNA-DNA e a an\u00e1lise de cariot\u00edpo atrav\u00e9s da electroforese em campo pulsado. Com a inven\u00e7\u00e3o da t\u00e9cnica de PCR (rea\u00e7\u00e3o em cadeia da polimerase), que veio permitir a amplifica\u00e7\u00e3o de fragmentos do DNA, deu-se a grande revolu\u00e7\u00e3o dos m\u00e9todos de biologia molecular. Muitas foram as abordagens que surgiram nomeadamente: a t\u00e9cnica de RAPD (ou polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente); o MS-PCR ou PCR *fingerprinting*, que usa como *primers* ou iniciadores sequ\u00eancias de bases nucleot\u00eddicas repetidas; o *nested* PCR que pressup\u00f5e duas reac\u00e7\u00f5es de PCR sequenciais, sendo a segunda amplifica\u00e7\u00e3o realizada sobre o primeiro fragmento amplificado; a an\u00e1lise de restri\u00e7\u00e3o de fragmentos amplificados por PCR, ou RFLP, que consiste no corte dos fragmentos amplificados com enzimas de restri\u00e7\u00e3o, entre muitas outras. O DNA riboss\u00f3mico (rDNA) tem-se revelado muito adequado para estimar rela\u00e7\u00f5es filogen\u00e9ticas, consideradas pelas correntes mais actuais da taxonomia como estando na base da classifica\u00e7\u00e3o taxon\u00f3mica, nomeadamente para leveduras. A sequencia\u00e7\u00e3o de genes do rDNA bem como an\u00e1lise de sequencia\u00e7\u00e3o multig\u00e9nica, s\u00e3o tidas como metodologias de refer\u00eancia na classifica\u00e7\u00e3o de leveduras. No entanto, trata-se de uma t\u00e9cnica que exige equipamento

e pessoal altamente especializado. A técnica de RFLP aplicada a regiões do rDNA, também designada por ARDRA, tem sido bastante utilizada na identificação de leveduras e outros organismos, como por exemplo bactérias, e tem-se revelado uma boa alternativa à sequenciação (KURTZMAN e ROBNET, 1998; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006).

Com o objectivo de agilizar a identificação de leveduras de interesse enológico, no laboratório de microbiologia do INIA-Dois Portos, desenvolveu-se um método baseado na amplificação de rDNA e digestão por enzimas de restrição – Perfis de Restrição – para a identificação de espécies de leveduras envolvidas no processo de produção de vinho.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Leveduras

Foram utilizadas 38 estirpes tipo de leveduras provenientes de colecções de cultura e 43 estirpes isoladas de ambientes víquicos previamente identificadas por sequenciação de rDNA, num total de 54 espécies.

Foram ainda analisados 727 isolados de leveduras, provenientes de diversos estudos realizados no nosso laboratório, nomeadamente em ensaios de vinificação, análises de controlo microbiológico em linhas de engarrafamento de adegas e isolamento de leveduras presentes em castas nacionais.

2.2 - Métodos moleculares para a identificação dos isolados

Os isolados foram cultivados em placas de meio sólido YEPD e incubadas à temperatura de 25 °C durante 48 a 72 horas. A extracção de DNA foi obtida de acordo com BALEIRAS-COUTO *et al.* (2005) ou através da lise das células por agitação com microesferas de vidro de acordo com SAMPAIO *et al.* (2001).

A obtenção dos Perfis de Restrição de uma região do 26S rDNA seguiu a metodologia descrita por BALEIRAS-COUTO *et al.* (2005). O produto da digestão com as enzimas de restrição *MseI*, *HaeIII*, *CfoI*, *ApaI* e *HinfI*, foi separado por electroforese em gel de agarose a 2,0 % utilizando-se o marcador de pesos moleculares 100 bp Ladder

(MBI Fermentas). As fotografias dos géis com os Perfis de Restrição foram analisadas utilizando o software Gelcompar II, versão 5.1 (Applied Maths).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validade do método Perfis de Restrição na identificação de leveduras ao nível da espécie foi verificada através do uso de estirpes certificadas provenientes de colecções de cultura, incluindo 38 estirpes tipo e 43 estirpes identificadas por outras metodologias de referência como a sequenciação de rDNA, num total de 54 espécies. A análise de restrição com a utilização das enzimas ensaiadas – *MseI*, *HaeIII*, *CfoI*, *ApaI* e *HinfI* – mostrou um grande poder discriminante na identificação de leveduras ao nível da espécie. Utilizando as ferramentas disponíveis no software GelCompar II foi possível a criação de uma base de dados de Perfis de Restrição de leveduras associadas a ambientes vínicos.

O método desenvolvido tem sido aplicado em diferentes estudos realizados no nosso laboratório, nomeadamente em isolados provenientes de uvas da casta Touriga Nacional, de ensaios de vinificação e de linhas de engarrafamento em adegas, num total de mais de 770 identificações.

No Quadro 1 são apresentadas as espécies detectadas em mostos de uvas da casta Touriga Nacional, provenientes de quatro vinhas localizadas em três regiões vitivinícolas diferentes e durante três anos experimentais. Foram identificadas 16 espécies entre 278 isolados. De referir a pequena diversidade encontrada nas uvas provenientes da vinha em Montemor-o-Novo comparativamente às outras regiões. Destacar ainda a grande diversidade encontrada no ano de 2007.

Quadro 1 - Espécies detectadas em mostos de uvas da casta Touriga Nacional, provenientes de diferentes locais e durante três anos experimentais.

| Local de origem | Espécies identificadas | | |
|------------------------|---|--|---|
| | 2005 | 2006 | 2007 |
| Azeitão | | <i>C. zemplinina</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Issatchenkia terricola</i> <i>I. hanoiensis</i> | |
| Dois Portos | <i>Candida fermentati</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> | <i>C. zemplinina</i> <i>I. terricola</i> <i>H. uvarum</i> <i>Saccharomyces vini</i> | <i>C. oleophila</i> <i>C. zemplinina</i> <i>H. uvarum</i> <i>I. terricola</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Zygoascus hellenicus</i> |
| Montemor-o-Novo | | <i>A. pullulans</i> | <i>A. pullulans</i> <i>C. fermentati</i> <i>H. uvarum</i> <i>Rhodosporiidium babjevae</i> |
| Palhacana | | <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Lachancea</i> sp. <i>H. uvarum</i> | <i>A. pullulans</i> <i>C. californica</i> <i>C. oleophila</i> <i>C. raillensis</i> <i>H. uvarum</i> <i>I. orientalis</i> <i>I. terricola</i> <i>M. pulcherrima</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>P. kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> <i>Z. hellenicus</i> |

Em ensaios de fermentação conduzidos à escala piloto foram obtidos 121 isolados de amostragens realizadas após 36 e 84 horas de fermentação, tendo sido identificadas 17 espécies de leveduras (Quadro 2). Os resultados obtidos mostram a detecção de espécies presentes nos dois tempos de amostragem correspondentes ao início e final da fermentação, designadamente *Candida zemplinina* (espécie não-*Saccharomyces* predominante), *C. diversa*, *Issatchenkia hanoiensis*, *Pichia kluyveri*, *Torulasporea delbrueckii* e *Zygoascus hellenicus*, enquanto outras espécies como *Hanseniaspora uvarum* e *Zygosaccharomyces bailii* foram detectadas apenas, respectivamente, no início e no final da fermentação.

Quadro 2 - Espécies de leveduras detectadas em estudos de fermentação de vinhos tintos

| Espécies identificadas ao longo da fermentação * | |
|--|--|
| 36 h | 84 h |
| <i>Candida diversa</i> | <i>C. cantarellii</i> |
| <i>Candida</i> sp. | <i>C. diversa</i> |
| <i>C. zemplinina</i> | <i>C. valida</i> |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>C. zemplinina</i> |
| <i>Issatchenkia hanoiensis</i> | <i>H. vineae</i> |
| <i>I. terricola</i> | <i>I. hanoiensis</i> |
| <i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> | <i>I. occidentalis</i> |
| <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> |
| <i>Zygoascus hellenicus</i> | <i>P. kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> |
| | <i>Saccharomycodes ludwigii</i> |
| | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| | <i>T. delbrueckii</i> |
| | <i>Z. hellenicus</i> |
| | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> |

* Espécies em negrito correspondem as leveduras presentes em ambos os tempos de fermentação.

No Quadro 3 são apresentadas as espécies de leveduras detectadas em diversos pontos de amostragem numa linha de engarrafamento de uma adega cooperativa, num total de 150 isolados. Foram identificadas 18 espécies de leveduras, algumas associadas a elevada perigosidade em termos de alteração de vinhos, como *Z. bailii*, *D. bruxellensis* e *T. delbrueckii*.

Quadro 3 - Espécies de leveduras detectadas em diversos pontos de uma linha de engarrafamento.

| Pontos de Amostragem | Espécies identificadas |
|--|---|
| Vinho ao longo do processo de engarrafamento | <i>Candida pararugosa</i> , <i>Issatchenkia occidentalis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Torulaspora delbruecki</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> |
| Bicos da enchedora | <i>C. cantarelli</i> , <i>C. pararugosa</i> , <i>C. spandovensi</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>I. occidentalis</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>T. delbruecki</i> , <i>Z. bailii</i> , |
| Maxilas da rolhadora | <i>C. norvegica</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cryptococcus carnescens</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>Filobasidium uniguttulatum</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>T. delbruecki</i> |
| Vinhos tintos após o engarrafamento | <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Brettanomyces custersiamae</i> , <i>I. occidentalis</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>T. delbruecki</i> , <i>Z. bailii</i> |
| Vinhos tintos um mês após o engarrafamento | <i>T. delbruecki</i> , <i>Z. bailii</i> |

4 - CONCLUSÕES

Analisando globalmente os resultados conclui-se que a análise dos Perfis de Restrição, obtidos pela digestão com as cinco enzimas estudadas, é adequada para discriminar ao nível da espécie as leveduras associadas ao processo de produção de vinhos.

A análise dos perfis de restrição, baseada na homologia de sequência de rDNA, demonstrou ser uma técnica bastante robusta, de fácil aplicabilidade e baixo custo de execução além de não requerer o uso de equipamentos sofisticados. O desenvolvimento e implementação desta técnica de identificação de leveduras no nosso laboratório permite a prestação deste serviço ao sector, constituindo uma mais valia para a fileira vitivinícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALEIRAS-COUTO M. M.; REIZINHO R. G.; DUARTE F.L. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 49-56.

FERNÁNDEZ-ESPINAR M.T.; MARTORELL P.; LLANOS R; QUEROL A. 2006. Molecular

Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. Cap. 3 *In: Yeasts in Food and Beverages*. (A. Querol, G. Fleet eds), Springer-Verlag, Berlin.

FLEET G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11-22.

KURTZMAN C.P.; ROBBETT C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.

LOUREIRO V.; MALFEITO-FERREIRA M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23-50.

SAMPAIO, J.P., GADANHO, M., SANTOS, S., DUARTE, F.L., PAIS, C., FONSECA, A., FELL, J.W., 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 687-697.

A COLECÇÃO DE ESTIRPES AUTÓCTONES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DAS PRINCIPAIS REGIÕES VITIVINÍCOLAS PORTUGUESAS

E. VIEIRA^{1,6}; J. DRUMONDE-NEVES^{1,5}; R. MACHADO¹; P. SILVA¹; A.C. GOMES²; S. SOUSA²; P.T. RAMOS³; F. ALEMÃO³; M.T. LIMA⁵; I. ARAÚJO⁶; F.L. DUARTE³; M.A. SANTOS^{2,4}; M. CASAL¹; D. SCHULLER¹

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é caracterizada por uma elevada variabilidade fenotípica, que está associada à ocorrência de estirpes em habitats naturais diversificados. Em trabalhos anteriores, demonstrámos a elevada diversidade de estirpes isoladas a partir de ambientes vitivinícolas na Região dos Vinhos Verdes, bem como a ocorrência de estirpes características para cada *terroir*. A recolha de estirpes autóctones foi alargada a outras regiões (Alentejo, Açores, Bairrada, Dão, Douro, Estremadura e Ribatejo), incluindo as castas mais representativas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho). Pelo uso de diferentes marcadores moleculares foram identificadas 662 estirpes a partir dos 4470 isolados recolhidos. A colecção de *S. cerevisiae* de ambientes vitivinícolas é utilizada para a selecção de estirpes mais apropriadas para vinificação e que realçam as propriedades sensoriais características. Adicionalmente, constitui um recurso para a conservação da biodiversidade e partilha de dados genéticos.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Colecção de leveduras; Leveduras autóctones.

¹ Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga

² BIOCANT, Centro de Inovação em Biotecnologia, BIOCANT PARK - Parque Tecnológico de Cantanhede, Cantanhede

³ Instituto Nacional de Recursos Biológicos, IP, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Dois Portos

⁴ CESAM e Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro

⁵ Centro de Investigação de Tecnologias Agrárias – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores.

⁶ Vinalia - Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, *Spin-off* da Universidade do Minho, Braga

1 - INTRODUÇÃO

As leveduras que conduzem a fermentação alcoólica contribuem de forma decisiva para a estrutura, complexidade e individualidade do perfil aromático de vinhos. Estes microrganismos fazem parte da microflora que se encontra na superfície da uva, do interior da adegas e de culturas *starter*, também designadas por estirpes industriais ou leveduras secas activas (LSA). Actualmente, existem cerca 200 LSAs e a maioria dos produtores de vinhos na Europa recorrem à sua utilização, uma vez que são considerados factor de garantia para uma fermentação rápida e consistente, e mantêm a homogeneidade de vinhos em anos consecutivos. No entanto, estas leveduras foram maioritariamente obtidas a partir de castas e de regiões vitivinícolas desconhecidas, que não possuem qualquer semelhança com as tipicidades das castas Portuguesas. O uso de espécies/estirpes autóctones é sempre preferível devido à sua melhor adaptação ao microecossistema e às condições climáticas de cada região, à capacidade de predominância sobre a flora microbiana não desejável, bem como à manutenção das propriedades sensoriais e do perfil característico dos vinhos de cada região. Apesar da sua longa história e tradição enraizada como país produtor de vinhos, em Portugal foram seleccionadas apenas 3 estirpes comerciais de *S. cerevisiae* das regiões vitivinícolas do Vinho Verde, Dão e Bairrada.

Estudos de genómica comparativa, recentemente realizados, revelaram os factores genéticos que moldam a capacidade de adaptação de *S. cerevisiae* a diferentes ambientes e que definem as suas características fenotípicas. A elevada diversidade genómica entre estirpes de *S. cerevisiae* afecta diferentes níveis genéticos, desde a frequência e localização de polimorfismos nucleotídicos até a variabilidade no número de cópias de genes (CARRETO *et al.*, 2008; LITI *et al.*, 2009; SCHACHERER *et al.*, 2009). O grupo de estirpes europeias de vinificação distingue-se das populações de outros continentes pela capacidade de fermentar rapidamente os açúcares do mosto e pela elevada variabilidade fenotípica (LITI *et al.*, 2009). A sequenciação completa do genoma de numerosas estirpes de *S. cerevisiae* de vinificação vai possibilitar a determinação dos factores genéticos envolvidos nas vias metabólicas dos principais compostos aromáticos.

No âmbito de estudos anteriores (SCHULLER *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2007; SCHULLER *et al.*, 2007), foi demonstrada a elevada diversidade

genética das estirpes de *S. cerevisiae* e a ocorrência de isolados característicos para diferentes sub-regiões da Região dos Vinhos Verdes. A colecção de estirpes autóctones foi alargada a outras regiões (Alentejo, Açores, Bairrada, Dão, Douro, Estremadura, Palmela e Ribatejo), incluindo as castas mais representativas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho). Esta colecção de estirpes de *S. cerevisiae* constitui um recurso importante tanto para estudos de avaliação e de conservação da biodiversidade, como também para a produção vinhos com aromas diferenciadores.

2 - OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *S. CEREVISIAE*

A recolha das amostras de uvas foi efectuada ao longo de vários anos em 37 vinhas de 9 regiões vitivinícolas, conforme indicado na Figura 1. Foram colhidos 2kg de uvas em cada um de 6 pontos de amostragem por vinha. Realizaram-se fermentações espontâneas a partir do mosto, a 22°C. Na fase final da fermentação obtiveram-se 30 colónias que foram armazenadas (glicerol, 30%, v/v; -80°C) para posterior extracção de DNA e identificação molecular pelos métodos abaixo mencionados.

Conforme resumido na Tabela 1, colheram-se 623 amostras das principais castas Portuguesas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho), sendo algumas amostragens realizadas nos mesmos locais em anos consecutivos. De todas as amostras colhidas até 2009, 46% (284) realizaram fermentações espontâneas completas, o que permitiu obter 8520 isolados. Até à data foram analisados 4470 isolados, obtendo-se 662 estirpes diferentes de *S. cerevisiae*. A identificação de mais 4050 isolados está actualmente em curso.

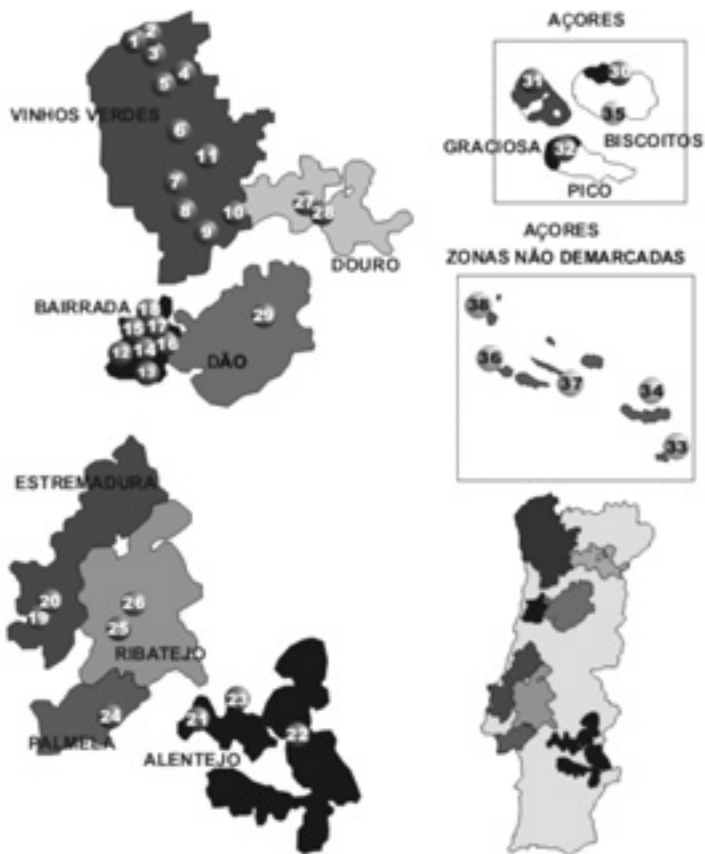


Figura 1 - Locais de amostragem nas diferentes Regiões Vitivinícolas em Portugal continental e ilhas.

Tabela 1 - Resumo das estirpes de *S. cerevisiae* obtidas a partir das amostras recolhidas nas diferentes regiões, para cada casta e ao longo dos anos 2001 a 2009.

| Região | Casta | Localização (consoante Figura 1) | Nº de amostras recolhidas | Nº de fermentações espontâneas | Nº de isolados colhidos | Nº de estirpes de <i>S. cerevisiae</i> |
|-------------------------------------|------------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|
| Vinhos Verdes | Alvarinho | 1, 2, 4 | 84 | 42 | 1260 | 202 |
| | Aveso | 9, 4, 8 | 78 | 30 | 900 | 145 |
| | Arinto | 4, 7 | 24 | 7 | 210 | 31 |
| | Loureiro | 11, 10, 4, 5 | 72 | 28 | 840 | 120 |
| | Touriga Nacional | 4, 10 | 24 | 8 | 240 | 18 |
| | Total | | 282 | 185 | 3450 | 516 |
| Bairrada | Baga | 12, 15, 18 | 30 | 10 | 300 | 60 |
| | Bical | 12, 14 | 24 | 1 | 30 | 1 |
| | Maria Gomes | 12, 17 | 24 | 1 | 30 | 19 |
| | Aragonez | 12, 13 | 24 | 3 | 90 | 19 |
| | Touriga Nacional | 12, 16 | 24 | 7 | 210 | 38 |
| | Total | | 126 | 22 | 630 | 137 |
| Extremadura | Aragonez | 19, 20 | 10 | 7 | 210 | 3 |
| | Arinto | 19, 20 | 11 | 10 | 300 | 1 |
| | Castello | 19, 20 | 6 | 6 | 180 | 1 |
| | Trincadeira | 19 | 1 | 1 | 30 | 0 |
| | Touriga Nacional | 19, 20 | 10 | 10 | 300 | 4 |
| | Total | | 38 | 34 | 1020 | 9 |
| Alentejo | Aragonez | 21, 22, 23 | 24 | 14 | 420 | 0 |
| | Trincadeira | 21 | 6 | 4 | 120 | 0 |
| | Touriga Nacional | 21 | 12 | 6 | 180 | 0 |
| | Total | | 53 | 34 | 1020 | 0 |
| Palmela | Castello | 24 | 6 | 5 | 150 | 0 |
| | Total | | 6 | 5 | 150 | 0 |
| Ribatejo | Castello | 25 | 6 | 3 | 90 | |
| | Castello | 26 | 6 | 4 | 120 | |
| | Total | | 12 | 7 | 210 | <i>Análise em curso</i> |
| Douro | Aragonez | 27 | 6 | 4 | 120 | |
| | Touriga Nacional | 28 | 6 | 2 | 60 | |
| | Total | | 12 | 6 | 180 | <i>Análise em curso</i> |
| Dão | Touriga Nacional | 29 | 6 | 6 | 180 | |
| | Total | | 6 | 6 | 180 | <i>Análise em curso</i> |
| Açores (Bisnitos) | Arinto | | 3 | 2 | 60 | |
| | Verdelho | 30 | 2 | 2 | 60 | |
| | Híbridos | | 2 | 0 | 0 | |
| | Total | | 7 | 4 | 120 | <i>Análise em curso</i> |
| Açores (Graciosa) | Arinto | | 2 | 2 | 60 | |
| | Verdelho | 31 | 4 | 4 | 120 | |
| | Híbridos | | 8 | 6 | 180 | |
| | Total | | 14 | 12 | 360 | <i>Análise em curso</i> |
| Açores (Pico) | Arinto | | 7 | 6 | 180 | |
| | Verdelho | | 4 | 4 | 120 | |
| | Terrantez | 32 | 1 | 0 | 0 | |
| | Híbridos | | 15 | 10 | 300 | |
| | Total | | 27 | 20 | 600 | <i>Análise em curso</i> |
| Açores (zonas não demarcadas) | Arinto | | 1 | 0 | 0 | |
| | Terrantez | 33-37 | 3 | 3 | 90 | |
| | Verdelho | | 3 | 2 | 60 | |
| | Híbridos | | 33 | 14 | 420 | |
| | Total | | 40 | 19 | 570 | <i>Análise em curso</i> |
| TOTAL | | | 623 | 284 | 8520 | 662 |

3 - FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS

O progresso das fermentações espontâneas foi monitorizado pela determinação da diminuição da massa do mosto (libertação de CO_2). As fermentações realizadas com castas recolhidas na Região dos Vinhos Verdes foram realizadas por *S. cerevisiae*. As fermentações de mostos da Bairrada foram realizadas, em alguns casos, por espécies não-*Saccharomyces* (por exemplo *Candida zemplinina*). Esta tendência aumentou para as regiões da Estremadura, Palmela, e Alentejo (sub-região Évora), onde a maioria das fermentações foram realizadas, por exemplo, pelas espécies *C. zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum* e *Issatchenkia orientalis*. Apenas em 17% das amostras recolhidas nestas regiões foram encontradas estirpes de *S. cerevisiae*. Exemplos de perfis fermentativos estão representados na figura 2. As fermentações realizadas por estirpes de *S. cerevisiae* demoraram maioritariamente 10 a 15 dias. A velocidade da fermentação não foi dependente do número de estirpes intervenientes, que variava entre 1 a 22 (Figura 2 A e B). As fermentações realizadas por espécies não-*Saccharomyces* decorreram de forma semelhante (Figura 2 D) ou muito mais lentamente (Figura 2 C).

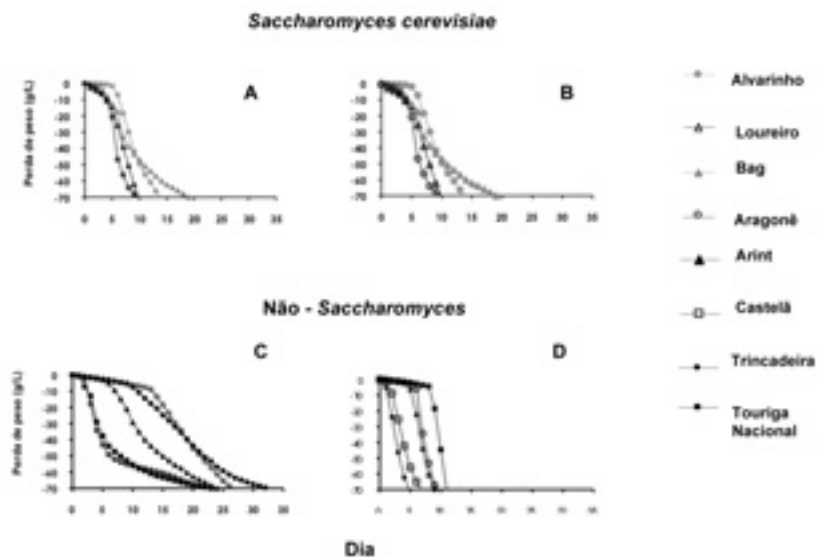


Figura 2 – Exemplos de perfis de fermentações espontâneas realizadas por estirpes de *S. cerevisiae* (A: 1-2 estirpes; B: 12-22 estirpes por fermentação) ou por espécies Não-*Saccharomyces* (C: fermentações lentas; D: fermentações rápidas), em mostos de diferentes castas.

4 - MÉTODOS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Diferentes métodos podem ser utilizados para a distinção de estirpes de *S. cerevisiae* (análise de microssatélites, sequências interdelta, perfis de restrição de DNA mitocondrial, electroforese em campo pulsado). A tipagem molecular de 23 estirpes comerciais mostrou a equivalência destes métodos (SCHULLER *et al.*, 2004). As sequências delta (300 bp) flanqueiam os retrotransposões TY1 e TY2 ou encontram-se dispersas no genoma de *S. cerevisiae*. São marcadores muito polimórficos (Figura 3 A), uma vez que o seu número e localização apresentam variabilidade intra-específica (LEGRAS e KARST, 2003; SCHULLER *et al.*, 2004). A análise dos perfis de restrição de DNA mitocondrial (Figura 3 B) baseia-se no diferente teor de GC no genoma nuclear e mitocondrial (40% e 20%, respectivamente). Locais de restrição, por exemplo da enzima *HinfI*, que são ricas em GC, encontram-se mais frequentemente no genoma nuclear. Contrariamente, o DNA mitocondrial é digerido em fragmentos maiores e que podem ser visualizados por electroforese. Microssatélites são sequências repetitivas de DNA de 2 a 5 nucleótidos. A amplificação de diferentes locis polimórficos e a sua detecção por electroforese capilar (Figura 3 C) é actualmente o método mais discriminatório para a distinção de estirpes de *S. cerevisiae* (PEREZ *et al.*, 2001; LEGRAS *et al.*, 2005).

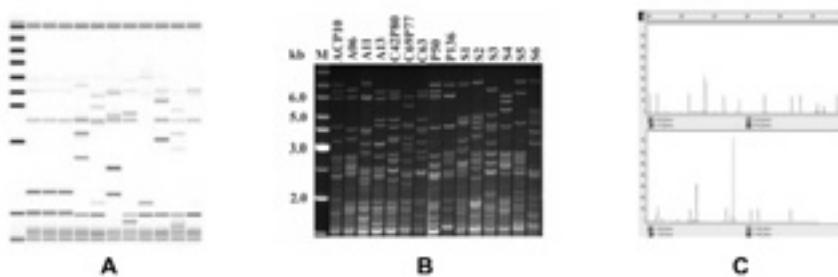


Figura 3 – Exemplos de perfis de sequências interdelta (A); DNA mitocondrial (B) e electroferograma de microssatélites (C) de leveduras vinárias.

Todos os isolados foram caracterizados pela análise de sequências interdelta ou perfis de restrição de DNA mitocondrial. Uma estirpe representativa de cada conjunto de isolados que partilhavam o mesmo perfil, foi ainda analisada quanto à sua combinação alélica de 11 microssatélites polimórficos.

4 - A BASE DE DADOS DE ESTIRPES VÍNICAS DE *S. CEREVISIAE* (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WINE STRAIN COLLECTION)

A compilação de todos os dados levou à constituição de uma colecção de estirpes autóctones de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* wine strain collection) que integram uma base de dados alojada no site (Figura 4), que permite fazer pesquisas as estirpes isoladas consoante a região, casta, ano de isolamento e características genéticas (alelos de microssatélites). Adicionalmente, permite consultar mais informação sobre as castas, regiões, detalhes experimentais e métodos moleculares utilizados. Prevê-se que o número de estirpes aumente ainda com a conclusão das tipagens moleculares de isolados obtidos nas regiões das ilhas dos Açores, Dão, Douro e Ribatejo. Estes materiais podem ser utilizados para a avaliação do seu potencial enológico. Adicionalmente, constituem um recurso importante para estudos de genómica evolutiva e ambiental.



Figura 4 – Homepage da base de dados de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*.

5 – CONCLUSÕES

A colecção de estirpes de *S. cerevisiae* é um contributo para a conservação da biodiversidade de leveduras que ocorrem nas principais regiões vitivinícolas Portuguesas. Os trabalhos realizados pretendem contribuir também para a selecção de estirpes mais apropriadas para a vinificação e a manutenção da tipicidade dos vinhos de um determinado local. No futuro próximo, a integração de dados genómicos, proteómicos e metabólicos de múltiplas estirpes de vinificação vai permitir modelar as interacções entre a casta, a levedura fermentativa e as condições de vinificação no sentido de obter vinhos com o maior potencial aromático possível.

AGRADECIMENTOS

Eugénia Vieira e João Drumonde Neves são recipientes de bolsas de doutoramento SFRH/BDE/33672/2009 (FCT) e M3.1.2/F/006/2008 (DRCT), respectivamente. Este estudo foi financiado pelos projectos POCI/AGR/56102/2004 e PTDC/AGR-ALI/103392/2008 da Fundação para a Ciência e Tecnologia, e recebeu também financiamento do Sétimo Programa-Quadro da Comunidade Europeia (FP7/2007-2013) sob o contrato n.º 232454. Os autores agradecem a todas as empresas e enólogos que apoiaram este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carreto, L., et al. BMC Genomics, **2008**, 9:524.
- Legras, J.L., Karst, F. FEMS Microbiol Lett, **2003**, 221: 249-255.
- Legras, J. L., et al., Int J Food Microbiol, **2005**, 102: 73-83
- Liti, G., et al. Nature, **2009**, 458(7236):337-341.
- Perez, M.A., et al., Lett Appl Microbiol, **2001**, 33: 461-466
- Richard, G.F., et al. Res Microbiol, **1999**, 150:589-602.
- Schacherer, J., et al. Nature, **2009**, 458(7236):342-345.
- Schuller, D., et al. FEMS Microbiol Letters, **2004**, 231:19-26
- Schuller, D., et al. FEMS Microbiology Ecology, **2005**, 51: 167-177.
- Schuller, D., M. Casal, Antonie Van Leeuwenhoek, **2007**, 91(2): 137-150
- Valero, E., et al., FEMS Yeast Research, **2005**, 5: p. 959-969
- Valero, E., et al., FEMS Yeast Research, **2007**, 7(2): 317-329



COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE ENVELHECIMENTO DE AGUARDENTE VÍNICA

Sara CANAS¹; Ilda CALDEIRA¹; A. P. BELCHIOR¹

RESUMO

A investigação sobre envelhecimento de aguardentes vínicas tem sido, desde há muito, focada na optimização do sistema tradicional, no sentido da obtenção de aguardentes de elevada qualidade. O presente trabalho tem como objectivo a avaliação do impacto de sistemas alternativos de envelhecimento sobre as características da aguardente. Para o efeito, procedeu-se à análise do extracto seco, do índice de polifenóis totais, dos compostos de massa molecular baixa (por HPLC), do teor de oxigénio dissolvido e das características cromáticas da mesma aguardente vínica Lourinhã envelhecida em vasilhas de madeira de 650 L (sistema tradicional) e em depósitos de aço inoxidável de 40 L com aduelas ou dominós de madeira (sistemas alternativos), durante o primeiro ano de envelhecimento. Os resultados obtidos revelam que as modificações observadas na composição química e na cor das aguardentes envelhecidas se encontram estreitamente relacionadas com o tipo de sistema de envelhecimento, sugerindo o envolvimento de muitos constituintes e fenómenos, governados por diversos factores.

Palavras-chave: aguardente vínica envelhecida, sistemas alternativos, composição química, cor.

1 – INTRODUÇÃO

No envelhecimento tradicional em vasilha de madeira a aguardente vínica sofre consideráveis alterações químicas e sensoriais, que determinam a sua qualidade. Tais modificações são consequência de diversos fenómenos, designadamente a transferência de compostos extraíveis da madeira para a aguardente (PUECH *et al.*, 1985; CANAS *et al.*, 1999). De entre estes compostos destacam-se os de baixa massa molecular e os taninos hidrolisáveis, pela sua influência na cor, adstringência, amargo e aroma da aguardente envelhecida (CANAS *et al.*, 2000a; CALDEIRA *et al.*, 2006a). A transferência de compostos extraíveis da madeira para a aguardente é principalmente condicionada

¹ INRB – INIA/Dois Portos. Quinta d'Almoinha. 2565-191 DOIS PORTOS. PORTUGAL. E-mail: evn.sara.canasmil.net4b.pt

pela tecnologia de envelhecimento, em que se encontram implicadas as características da vasilha de madeira (VIRIOT *et al.*, 1993; CANAS *et al.*, 2000b; BELCHIOR *et al.*, 2001; CALDEIRA *et al.*, 2002; CALDEIRA *et al.*, 2006a,b; CANAS *et al.*, 2008) e da cave de envelhecimento (CANTAGREL *et al.*, 1991). Nas últimas décadas estes factores têm sido alvo de intensa pesquisa, no sentido de otimizar o processo de envelhecimento tradicional. Contudo, este tipo de sistema de envelhecimento apresenta custos elevados, resultantes sobretudo da imobilização de capital em aguardente e em vasilhas de madeira por um período de tempo alargado, e das perdas de aguardente por evaporação (MOUTONNET *et al.*, 1998; CANAS *et al.*, 2002).

No actual estado do conhecimento e do desenvolvimento tecnológico, os estudos efectuados em vinho têm demonstrado que os sistemas alternativos, recorrendo à utilização de peças de madeira em depósitos de aço inoxidável, parecem ser a solução possível para este problema, assegurando a qualidade do vinho (DEL ÁLAMO SANZA *et al.*, 2004; FRANGIPANE *et al.*, 2007; DEL ÁLAMO *et al.*, 2008). Relativamente ao envelhecimento de aguardente vínica em sistemas alternativos, o primeiro trabalho foi realizado na Estação Vitivinícola Nacional (BELCHIOR *et al.*, 2003). Na sequência do mesmo, foi concebido e executado o presente estudo, com o objectivo de comparar o efeito do sistema tradicional com o de sistemas alternativos no extracto seco, índice de polifenóis totais, compostos de massa molecular baixa (determinados por HPLC), teor de oxigénio dissolvido e características cromáticas de uma aguardente vínica Lourinhã, durante o primeiro ano de envelhecimento.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Aguardentes

A mesma aguardente branca Lourinhã (78,7 % v/v) foi sujeita a envelhecimento em três sistemas, em duplicado: vasilhas novas de madeira de 650 L (V); depósitos de aço inoxidável de 40 L com aduelas de madeira (A); depósitos de aço inoxidável de 40 L com dominós de madeira (D). Em cada sistema foram utilizados dois tipos de madeira: castanheiro português (*Castanea sativa* Mill.) ou carvalho francês Limousin (*Quercus robur* L.). As vasilhas e as peças de madeira, com queima forte, foram produzidas na tanoria JM Gonçalves (Palaçoulo, Portugal). A quantidade de aduelas (40 cm x 10 cm x

3 cm; 17 cm x 10 cm x 3 cm) e de dominós (7 cm x 3 cm x 0,8 cm) foi calculada de modo a reproduzir a relação superfície/volume de uma vasilha de 650 L. As vasilhas e os depósitos de aço inoxidável foram colocados na Adega Cooperativa de Lourinhã, nas mesmas condições de envelhecimento, sendo as aguardentes amostradas após 6, 30, 90, 180 e 360 dias de envelhecimento (total de 60 amostras).

2.2 - Métodos

2.2.1 – Determinação do extracto seco

O extracto seco foi analisado através do método usual da OIV (OIV, 1994).

2.2.2 – Determinação dos polifenóis totais

O índice de polifenóis totais foi determinado com base na leitura da absorvência a 280 nm (RIBÉREAU-GAYON, 1970).

2.2.3 – Determinação das características cromáticas

As características cromáticas (CIELab) foram determinadas a partir da leitura da transmitância a intervalos de comprimento de onda de 5 nm ao longo do espectro visível (380 - 770 nm): luminosidade (L^*); saturação (c^*); coordenadas rectangulares (a^* e b^*). A coordenada a^* varia entre verde ($-a^*$) e vermelho ($+a^*$) e a coordenada b^* varia entre azul ($-b^*$) e amarelo ($+b^*$).

2.2.4 – Análise de compostos extraíveis de massa molecular baixa

As amostras de aguardente foram adicionadas de um padrão-interno, 4-hidroxibenzaldeído (20 mg/L), filtradas em filtro de seringa 0,45 μm (Titan) e analisadas por injeção directa de 20 μl . Na análise cromatográfica foi aplicado o método desenvolvido e validado por CANAS *et al.* (2003), recorrendo a um equipamento de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) *Lachrom Merck Hitachi*. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna *Merck Lichrospher RP18*, 250 mm x 4 mm (5 μm). O controle, aquisição e tratamento de dados cromatográficos foi efectuado através do software *HSM D-7000* (Merck).

2.2.5 – Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos, realizado no programa *Statistica vs '98 edition* (Statsoft Inc., Tulsa, E.U.A.), consistiu numa análise de variância (ANOVA). A comparação das médias foi baseada no teste da mínima diferença significativa (LSD).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que o sistema de envelhecimento origina diferenças muito significativas na composição química e nas características cromáticas das aguardentes durante o primeiro ano de envelhecimento (Quadro 1). As aduelas induzem o maior enriquecimento em extracto seco e em polifenóis totais. Comparativamente, as aguardentes envelhecidas com dominós ou em vasilhas de madeira apresentam extracto seco intermédio e inferior, respectivamente, sendo semelhantes em termos de polifenóis totais.

Quadro 1 - Efeito do sistema de envelhecimento na composição química e na cor das aguardentes envelhecidas

| | <i>Efeito</i> | Vasilha (V) | Aduelas (A) | Dominós (D) |
|------------|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ES | ** | 0,59 ± 0,31 <i>a</i> | 0,95 ± 0,62 <i>c</i> | 0,73 ± 0,36 <i>b</i> |
| Ipt | ** | 17,62 ± 7,50 <i>a</i> | 21,63 ± 15,11 <i>b</i> | 14,80 ± 6,02 <i>a</i> |
| L* | ** | 90,91 ± 4,36 <i>c</i> | 87,17 ± 5,88 <i>b</i> | 83,88 ± 7,71 <i>a</i> |
| c* | ** | 32,29 ± 14,16 <i>a</i> | 42,55 ± 18,21 <i>b</i> | 48,85 ± 20,06 <i>c</i> |
| a* | ** | 1,21 ± 1,08 <i>a</i> | 3,31 ± 3,29 <i>b</i> | 6,13 ± 4,91 <i>c</i> |
| b* | ** | 32,23 ± 14,18 <i>a</i> | 42,37 ± 18,04 <i>b</i> | 48,39 ± 19,64 <i>c</i> |
| OD | ** | 12,97 ± 4,43 <i>a</i> | 19,73 ± 1,47 <i>c</i> | 18,27 ± 2,78 <i>b</i> |

x ± SD (média ± desvio padrão) de 20 valores; Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença muito significativa (** p < 0.01); ES – Extracto seco (g/L); Ipt – Índice de polifenóis totais; L* - Luminosidade; c* - Saturação; a*, b* - Coordenadas rectangulares; OD – Oxigénio dissolvido (mg/L).

No referente às características cromáticas, as aguardentes envelhecidas com dominós exibem maior evolução do que as restantes, isto é, menor luminosidade (maior intensidade da cor), maior saturação e coordenadas a* e b* mais elevadas (tonalidades

vermelha e amarela mais acentuadas). As aguardentes envelhecidas com aduelas e em vasilhas de madeira revelam uma evolução cromática intermédia e inferior, respectivamente. Os resultados da análise sensorial destas aguardentes, realizada após 180 dias de envelhecimento, traduzem já esta mesma diferenciação (Caldeira *et al.*, 2010). Contrariamente ao constatado nos trabalhos efectuados com aguardentes envelhecidas no sistema tradicional (CANAS *et al.*, 2000a; BELCHIOR *et al.*, 2001), não é observada correlação positiva entre as características cromáticas e a composição química (índice de polifenóis totais e extracto seco) das aguardentes em estudo. Este aspecto sugere que outros compostos, não quantificados através do índice de polifenóis totais ou do extracto seco, podem determinar a cor das aguardentes vínicas envelhecidas, sendo o seu efeito mais evidente com a utilização de dominós.

O facto do teor de oxigénio dissolvido (inversamente proporcional ao oxigénio consumido) ser consonante com o extracto seco e o índice de polifenóis totais destas aguardentes, indicia que o oxigénio é um factor determinante da composição química das mesmas, estando implicado na alteração de compostos fenólicos e não fenólicos. MOSEDALE e PUECH (1998) consideram as oxidações as reacções mais importantes do processo de envelhecimento, envolvendo tanto os compostos do destilado como os compostos extraídos da madeira. Contudo, se o oxigénio fosse o único factor-chave para as alterações observadas, então as aguardentes envelhecidas com aduelas deveriam apresentar a cor mais evoluída, o que não se verifica. Os resultados sugerem que muitos constituintes e fenómenos governados por diversos factores se encontram implicados em tais alterações, que são específicas de cada tipo de sistema de envelhecimento. As diferenças podem estar relacionadas com a taxa de extracção dos compostos da madeira e a sua subsequente transformação na aguardente. Efectivamente, analisando os compostos de massa molecular baixa extraídos da madeira pelas aguardentes durante o primeiro ano de envelhecimento, verifica-se a existência de uma diferenciação muito significativa associada ao sistema de envelhecimento (Quadro 2). As aguardentes envelhecidas em vasilha apresentam os teores mais elevados de HMF, de furfural, de ácido vanílico, de coniferaldeído e de sinapaldeído e menores teores de ácido elágico e de siringaldeído. Já as aguardentes envelhecidas com aduelas são as mais ricas em 5-metilfurfural, ácido gálgico e vanilina, enquanto as aguardentes envelhecidas com dominós possuem teores superiores de ácido síringico.

Quadro 2 - Efeito do sistema de envelhecimento nos teores de compostos de massa molecular baixa das aguardentes envelhecidas (mg/L A.P.)

| | <i>Efeito</i> | Vasilha (V) | Aduelas (A) | Dominós (D) |
|--------|---------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| HMF | ** | 16,05 ± 8,77 <i>c</i> | 6,36 ± 2,26 <i>b</i> | 2,61 ± 0,66 <i>a</i> |
| Furf | ** | 50,80 ± 16,79 <i>b</i> | 22,26 ± 2,82 <i>a</i> | 21,48 ± 1,86 <i>a</i> |
| 5mfurf | ** | 0,11 ± 0,09 <i>a</i> | 0,64 ± 0,19 <i>b</i> | 0,12 ± 0,08 <i>a</i> |
| Gal | ** | 25,86 ± 15,04 <i>b</i> | 47,92 ± 27,46 <i>c</i> | 6,54 ± 4,09 <i>a</i> |
| Van | ** | 9,88 ± 4,36 <i>b</i> | 3,76 ± 1,52 <i>a</i> | 3,19 ± 1,02 <i>a</i> |
| Sg | ** | 0,59 ± 0,47 <i>b</i> | 0,39 ± 0,34 <i>a</i> | 1,11 ± 0,55 <i>c</i> |
| Elag | ** | 6,14 ± 3,24 <i>a</i> | 8,88 ± 4,99 <i>b</i> | 9,71 ± 5,38 <i>b</i> |
| Vanil | ** | 2,49 ± 0,88 <i>b</i> | 3,06 ± 1,13 <i>c</i> | 2,26 ± 0,47 <i>a</i> |
| Sgald | ** | 6,69 ± 5,59 <i>a</i> | 9,32 ± 8,25 <i>b</i> | 9,62 ± 8,42 <i>b</i> |
| Cfald | ** | 4,66 ± 2,65 <i>c</i> | 3,83 ± 1,54 <i>b</i> | 1,19 ± 0,40 <i>a</i> |
| Snald | ** | 14,88 ± 9,03 <i>c</i> | 13,11 ± 5,70 <i>b</i> | 5,09 ± 2,15 <i>a</i> |

x ± SD (média ± desvio padrão) de 20 valores; Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença muito significativa (** p < 0.01); 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural (Furf), 5-metil-furfural (5mfurf), ácido gálico (Gal), ácido vanílico (Van), ácido siringico (Sg), ácido elágico (Elag), vanilina (Vanil), siringaldeído (Sgald), coniferaldeído (Cfald), sinapaldeído (Snald).

É de salientar a influência do tipo de sistema de envelhecimento nos teores de aldeídos furânicos (HMF, furfural e 5-metilfurfural) e de vanilina – que são considerados compostos odorante-chave da aguardente envelhecida (CALDEIRA *et al.*, 2008).

As diferenças detectadas, sobretudo entre as aguardentes envelhecidas em vasilhas de madeira e as envelhecidas com dominós, podem ser atribuídas à acção combinada de diversos factores, designadamente a forma/dimensão da madeira (ARAPITSAS *et al.*, 2004; DEL ÁLAMO *et al.*, 2004; DE BEER *et al.*, 2008), o seu tratamento térmico específico (BOZALONGO *et al.*, 2007; CANAS *et al.*, 2007; FRANGIPANE *et al.*, 2007) e o estado de oxidação da aguardente (CALVO *et al.*, 1992; CANAS *et al.*, 2009a).

Importa referir que o efeito do sistema de envelhecimento no índice de polifenóis totais, na luminosidade, na coordenada a* e no teor de oxigénio dissolvido (CANAS *et al.*, 2009b), bem como nos teores de HMF, furfural, ácido vanílico, ácido siringico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído é condicionado pelo tempo de enve-

lhecimento. Existe ainda interacção entre o sistema de envelhecimento e o tipo de madeira para HMF, furfural, 5-metilfurfural, ácido galhico, ácido síringico, vanilina, coniferaldeído e sinapaldeído.

4 - CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, os resultados obtidos demonstram que a composição química e a cor das aguardentes vnicas estão estreitamente dependentes do sistema de envelhecimento, sugerindo o envolvimento de muitos constituintes e fenómenos, governados por factores como a forma/dimensão da madeira, o seu tratamento térmico e o estado de oxidação da aguardente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAPITSAS P., ANTONOPOULOS A., STEFANO E., DOURTOGLOU V.G., 2004. Artificial ageing of wines using oak chips. *Food Chem.*, **86**, 563-570.
- BELCHIOR A.P., ALMEIDA T.G.T., MATEUS A.M., CANAS S., 2003. Ensaio laboratorial sobre a cinética de extracção de compostos de baixa massa molecular da madeira pela aguardente. *Ciência Téc. Vitiv.*, **18**, 29-41.
- BELCHIOR A.P., CALDEIRA I., COSTA S., TRALHÃO G., FERRÃO A., MATEUS A.M., CARVALHO E., 2001. Evolução das características físico-químicas e organolépticas de aguardentes *Lourinhã* ao longo de cinco anos de envelhecimento em madeira de carvalho e de castanheiro. *Ciência Téc. Vitiv.*, **16**, 81-94.
- BOZALONGO R., CARRILLO J.D., TORROBA M.A.F., TENA M.T., 2007. Analysis of French and American oak chips with different toasting degrees by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat. A*, **1173**, 10-17.
- CALDEIRA I., ANJOS O., PORTAL V., BELCHIOR A.P., CANAS S., 2010. Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels. *Anal. Chim. Acta*, **660**, 43-52.

- CALDEIRA I., BELCHIOR A.P., CLÍMACO M.C., BRUNO DE SOUSA R., 2002. Aroma profiles of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Anal. Chim. Acta*, **458**, 55-62.
- CALDEIRA I., BRUNO DE SOUSA R., BELCHIOR A.P., CLÍMACO M.C., 2008. A sensory and chemical approach to the aroma of wooden aged *Lourinhã* wine brandy. *Ciência Tec. Vitiv.*, **23**, 97-110.
- CALDEIRA I., CLÍMACO M.C., BRUNO DE SOUSA R., BELCHIOR A.P., 2006b. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: modification induced by heat treatment. *J. Food Eng.*, **76**, 202-211.
- CALDEIRA I., MATEUS A.M., BELCHIOR A.P., 2006a. Flavour and odour profile modifications during the first five years of *Lourinhã* brandy maturation on different wooden barrels. *Anal. Chim. Acta*, **563**, 264-273.
- CANAS S., BELCHIOR A.P., CALDEIRA I., SPRANGER M.I., BRUNO DE SOUSA R., 2000a. La couleur et son évolution dans les eaux-de-vie *Lourinhã* pendant les trois premières années du vieillissement. *Ciência Tec. Vitiv.*, **15**, 1-14.
- CANAS S., BELCHIOR A.P., FALCÃO A., GONÇALVES J.A., SPRANGER M.I., BRUNO DE SOUSA R., 2007. Effect of heat treatment on the thermal and chemical modifications of oak and chestnut wood used in brandy ageing. *Ciência Tec. Vitiv.*, **22**, 5-14.
- CANAS S., BELCHIOR A.P., MATEUS A.M., SPRANGER M.I., BRUNO DE SOUSA R., 2002. Kinetics of impregnation/evaporation and release of phenolic compounds from wood to brandy in experimental model. *Ciência Tec. Vitiv.*, **17**, 1-14.
- CANAS S., BELCHIOR A.P., SPRANGER M.I., BRUNO DE SOUSA R., 2003. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.*, **26**, 496-502.
- CANAS S., CALDEIRA I., BELCHIOR A.P., 2009a. Comparison of alternative systems for the ageing of wine brandy. Oxygenation and wood shape effect. *Ciência. Tec. Vitiv.*, **24**, 33-40.
- CANAS S., CALDEIRA I., BELCHIOR A.P., 2009b. Comparison of alternative systems for the ageing of wine brandy. Wood shape and wood botanical species effect. *Ciência. Tec. Vitiv.*, **24**, 90-99.

- CANAS S., LEANDRO M.C., SPRANGER M.I., BELCHIOR A.P., 1999. Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5023-5030.
- CANAS S., LEANDRO M.C., SPRANGER M.I., BELCHIOR A.P., 2000b. Influence of botanical species and geographical origin on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage. *Holzforschung*, **54**, 255-261.
- CANAS S., VAZ M., BELCHIOR A.P., 2008. Influence de la dimension du fût dans les cinétiques d'extraction/oxydation des composés phénoliques du bois pour les eaux-de-vie Lourinhã. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*. 143-146. Bertrand A. (Ed.), Lavoisier - TEC & DOC, Paris.
- CALVO A., CAUMEIL M., PINEAU J., 1992. Extraction des polyphénols et des aldéhydes aromatiques pendant le vieillissement du cognac, en fonction du titre alcoolique et du "degré d'épuisement" des fûts. In: *Élaboration et connaissance des spiritueux*. 562-566. Cantagrel R. (Ed.), Lavoisier - TEC & DOC, Paris.
- CANTAGREL R., MAZERROLLES G., VIDAL J.P., GALY B., BOULESTEIX J.M., LABLANQUIE O., GASCHET J., 1991. Evolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de cognac au cours du vieillissement. 2ème partie: incidence de la température et de l'hygrométrie des lieux de stockage. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*. 573-576. Bertrand A. (Ed.), Lavoisier - TEC & DOC, Paris.
- DE BEER D., JOUBERT E., MARAIS J., DU TOIT W., FOURIE B., MANLEY M., 2008. Characterisation of pinotage wine during maturation on different oak products. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **29**, 39-49.
- DEL ÁLAMO M., NEVARES I., GALLEGU L., MARTIN C., MERINO S., 2008. Ageing markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Anal. Chim. Acta*, **621**, 86-99.
- DEL ÁLAMO SANZA M., DOMÍNGUEZ I.N., CÁRCEL L.M.C., NAVAS GRACIA L., 2004. Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal. Chim. Acta*, **513**, 229-237.
- FRANGIPANE M.T., DE SANTIS D., CECCARELLI A., 2007. Influence of oak woods of diffe-

rent geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chem.*, **103**, 46-54.

MOSEDALE J.R., PUECH J.-L., 1998. Wood maturation of distilled beverages. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 95-101.

MOUTOUNET M., MAZAURIC J.P., SAINT-PIERRE B., HANOCQ J.F., 1998. Gaseous exchange in wines stored in barrels. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **4**, 115-129.

OIV, 1994. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons*. OIV, Paris, 311 p.

RIBEREAU-GAYON P., 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, **52**, 627-631.

PUECH J.-L., JOURET C., GOFFINET B., 1985. Évolution des composés phénoliques du bois de chêne au cours du vieillissement de l'armagnac. *Sci. Alim.*, **5**, 379-392.

VIRIOT C., SCALBERT A., LAPIERRE C., MOUTOUNET M., 1993. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, 1872-1879.

OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CASTAS PRESENTES EMMOSTOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES NUCLEARES

Geni C. ZANOL¹; João BRAZÃO¹; Pedro CLÍMACO¹; Paula MARTINS-LOPES²; M. Margarida BALEIRAS-COUTO¹; Henrique P. GUEDES-PINTO²; José E. EIRAS-DIAS¹

RESUMO

O desenvolvimento de técnicas para a detecção e identificação de castas em mostos e vinhos reveste-se da maior importância para garantir a autenticidade do produto e detectar falsificações e erros de rotulagem. O presente trabalho teve como objectivo a identificação molecular de seis castas brancas e cinco tintas em mostos monovariais através de seis e/ou nove *loci* de microsatélites (SSRs) nucleares, tendo-se utilizado os seis recomendados pela OIV (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 e VVS2) e os três recomendados pelo GRAPEGEN06 (VVMD25, VVMD28 e VVMD32). Além da validação de um método eficaz para a extracção de ADN em mostos, optimizaram-se as condições de reacção de polimerização em cadeia (PCR). Os resultados obtidos demonstraram que é possível obter a amplificação dos nove SSRs em mostos com apenas duas reacções PCR Multiplex, bem como a separação destes mediante electroforese capilar. Para cada SSR, o perfil do tamanho dos fragmentos amplificados nos mostos de cada casta pela PCR Multiplex foi idêntico ao obtido por reacção PCR individual, quer dos mostos, quer das folhas das respectivas castas.

Palavras-chaves: microsatélites, mostos, traçabilidade.

1 - INTRODUÇÃO

Para os actuais padrões legislativos da União Europeia sobre a traçabilidade alimentar, o desenvolvimento de técnicas para a detecção e identificação de castas em vinhos reveste-se da maior importância para garantir a autenticidade do produto e detectar falsificações e erros de rotulagem.

¹ Instituto Nacional de Recursos Biológicos, L-INIA Dois Portos, Quinta d'Almoíña, 2565-191 Dois Portos, Portugal. Autor para correspondência: geni.zanol@inrb.pt

² Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (CGB-UTAD/IBB). P.O. Box 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal.

Nos últimos anos, análises realizadas à fracção proteica (HAYASAKA *et al.*, 2001), compostos fenólicos (REVILLA *et al.*, 2001), minerais (MONACI *et al.*, 2003) e substâncias aromáticas (RAPP, 1988) têm sido utilizadas para a identificação de castas ou da origem geográfica de vinhos. Para a videira, os microsssatélites ou 'Simple Sequence Repeat' (SSR) *loci* são marcadores moleculares amplamente utilizados e, portanto, as actuais bases de dados de perfis de microsssatélites disponíveis para um grande número de castas são importantes ferramentas já em uso para a identificação genética de castas que poderão, em breve, vir a ser utilizadas para a detecção dos respectivos ADN de castas em mostos e vinhos. Estudos visando a identificação qualitativa da composição varietal foram realizados através da análise de microssatélites (SSR), feita a partir de ADN extraído de mostos e vinhos experimentais (SIRET *et al.*, 2002; BALEIRAS-COUTO e EIRAS-DIAS, 2006; SAVAZZINI e MARTINELLI, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2007). No entanto, a dificuldade de extracção de ADN a partir de mostos e vinhos tem sido um problema comum referido por vários autores.

O presente trabalho teve como objectivo otimizar o método para a extracção de ADN a partir de mostos monovarietais, de castas brancas e tintas, bem como a identificação molecular através da análise de nove *loci* de SSR nucleares.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Obtenção de mostos

Foram colhidas uvas de seis castas brancas (Alvarinho, Fernão Pires, Loureiro, Malvasia Fina, Moscatel Galego e Viosinho) e cinco castas tintas (Aragonez, Tinto Cão, Touriga Franca, Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon), tendo-se determinado a data da vindima em função do teor em álcool provável (11,5 - 12% v/v). As microvinificações foram realizadas em duplicado e alíquotas de 2,0 ml de mostos foram colhidas e imediatamente guardadas à -80 °C até serem utilizadas para a extracção do ADN.

2.2 - Extracção de ADN partir de folhas

Folhas jovens foram colhidas de plantas da Colecção Ampelográfica Nacional (CAN) localizada no L-INIA Dois Portos. As folhas (100 mg) foram maceradas em azoto líquido e utilizadas para a extracção do ADN, recorrendo-se ao método de extracção descrito por THOMAS *et al.* (1993).

2.3 - Extração de quantificação ADN a partir de mostos

Para a extração de ADN a partir de mostos de castas brancas e tintas foram avaliados dois métodos de extração. O primeiro método foi o descrito por THOMAS *et al.* (1993), mas com algumas alterações, nomeadamente, no que diz respeito às quantidades e concentrações dos tampões de extração e lise dos núcleos. Aliquotas de 2,0 ml de mosto foram descongeladas e centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos. O precipitado foi diluído em 0,4 mL do tampão de extração (Sorbitol 350 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 5,0 mM, bissulfito de sódio 70 mM e polivinilpirrolidona a 2,0 %). Após agitação, adicionou-se 0,4 mL do tampão lise dos núcleos modificado (3,0 % CTAB, Tris-HCl 200 mM, EDTA 5,0 mM, NaCl 2,5 M, pH=7,5) e 0,18 mL de N-lauril sarcosil a 5,0%. A solução foi então incubada a 65 °C durante 15 minutos. A partir de então, procedeu-se à purificação e precipitação do ADN de acordo com o protocolo original.

O segundo método de extração de ADN baseou-se no método CTAB descrito por DOYLE e DOYLE (1987) seguido de algumas alterações. O precipitado foi diluído em 0,75 mL do tampão de extração CTAB (CTAB a 3%, Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0; EDTA a 25 mM e NaCl a 2,0 M). Como agente redutor utilizou-se o 2-mercaptoetanol a 0,2 % e polivinilpirrolidona a 2 %. As condições de purificação, precipitação, lavagem e diluição do ADN foram as mesmas utilizadas no método anterior.

O ADN extraído foi quantificado por comparação de intensidade de bandas observadas em gel de agarose a 0,8 % (p/v) com bandas produzidas por um marcador de peso molecular conhecido (Lambda *HindIII*, MBI Fermentas). A concentração e a pureza do ADN também foram determinadas em espectrofotómetro (NanoDrop R ND-1000 UV-Vis). Neste caso, o ADN foi considerado de boa qualidade quando a relação da densidade óptica obtida (DO) no comprimento de onda de 260/280 nm foi maior que 1,6.

2.4 - Análise por microssatélites

Procedeu-se à amplificação por PCR individual dos seis *loci* de microssatélites (SSR) recomendados pela OIV: VVMD5 e VVMD7 (BOWERS *et al.*, 1996), VVMD27 (BOWERS *et al.*, 1999), VrZAG62 e VrZAG79 (SEFC *et al.*, 1999) e VVS2 (THOMAS e SCOTT, 1993). As condições de amplificação para cada SSR foram efectuadas de acordo com CUNHA *et al.* (2009). As reacções PCR Multiplex foram realizadas utili-

zando-se o Kit PCR Multiplex (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A primeira reacção Multiplex foi realizada utilizando-se cinco pares de *primers*: VVMD7 e VrZAG62 (OIV) mais os três referidos por BOWERS *et al.* (1999) e recomendados pelo projecto GRAPEGEN06 (VVMD25, VVMD28 e VVMD32). Os quatro restantes SSR *loci* recomendados pelo OIV, foram incluídos na segunda reacção Multiplex PCR. Para estimar a eficiência da amplificação, os produtos de PCR e Multiplex PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,2 %. A detecção dos fragmentos amplificados por PCR foi realizada mediante sequenciador automático CEQ™ 8000 Series Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Extração de ADN

Recorrendo ao protocolo de extração de ADN a partir de folhas jovens, em que compostos fenólicos e polissacáridos estão ausentes ou apresentam-se em concentrações baixas (LODHI *et al.*, 1994), obteve-se ADN em quantidades suficientes e sem mostrar problemas de amplificação dos SSRs durante a reacção da polimerase em cadeia (PCR).

Os contaminantes tais como fenóis, terpenos e polissacáridos, libertados durante a lise celular de tecidos vegetais maduros e altamente diferenciados como os bagos, aderem irreversivelmente ao ADN, inibindo a amplificação por PCR (WEISING *et al.*, 2005). Por isso, foram testados dois métodos de extração de ADN a partir de mostos visando-se um protocolo de extração eficaz, sem a presença destes contaminantes. Ambos os métodos mostraram-se eficientes por apresentarem uma boa repetibilidade e quantidade de ADN após extração (Figuras 1 e 2). A integridade do ADN extraído foi inicialmente avaliada através de corrida em gel de agarose. Todas as amostras, em duplicado, apresentaram uma banda única e de alto peso molecular indicando uma boa qualidade do ADN extraído.

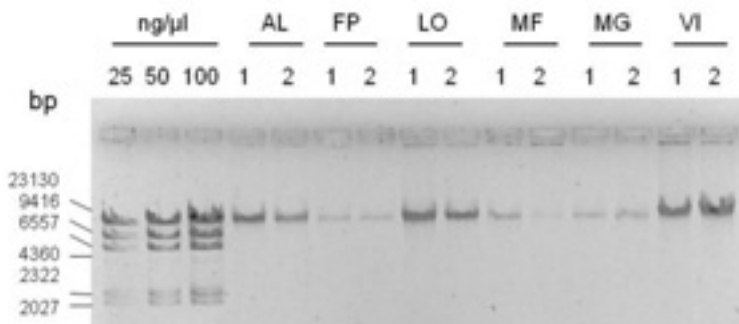


Figura 1 - ADN genómico extraído (método Thomas *et al.*) a partir de mostos das castas brancas: AL= Alvarinho, FP= Fernão Pires, LO= Loureiro, MF= Malvasia Fina, MG= Moscatel Galego e VI=Viosinho. À esquerda, marcador ADN *Lambda HindIII* (MBI Fermentas) nas concentrações 25, 50 e 100 ng/µl. Os números 1 e 2 correspondem aos duplicados das microvinificações.

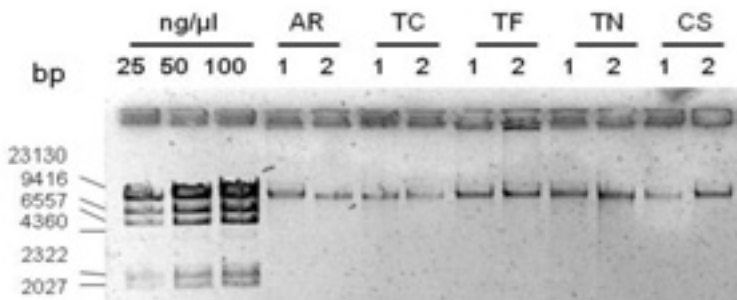


Figura 2 - ADN genómico extraído (método CTAB) a partir de mostos das castas tintas: AR= Aragonez, CS=Cabernet Sauvignon, TC=Tinto Cão, TF=Touriga Franca, TN= Touriga Nacional. À esquerda, marcador ADN *Lambda HindIII* (MBI Fermentas) nas concentrações 25, 50 e 100 ng/µl. Os números 1 e 2 correspondem aos duplicados das microvinificações.

Entretanto, recorrendo-se à determinação da quantidade e pureza do ADN por densidade óptica (DO) em espectrofotómetro (Nanodrop), verificou-se que o primeiro método de extracção apresentou fortes restrições quanto a pureza do ADN ao exibir uma razão entre as leituras das absorvância 260/280 nm inferior a 1,4, principalmente para as amostras de mostos de castas tintas (Quadro 1) os quais contêm uma vasta gama de metabolitos secundários que dificultam a extracção e purificação do ADN.

Quadro 1 - Comparação dos métodos de extracção de ADN a partir de mostos relativamente à concentração e pureza do ADN, determinados por densidade óptica em espectrofotómetro

| Cultivar | Método de extracção | Concentração (ng/ul) | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Aragonez | Thomas <i>et al.</i> | 59,07 | 1,36 |
| | CTAB | 136,78 | 1,69 |
| Touriga Nacional | Thomas <i>et al.</i> | 58,31 | 1,28 |
| | CTAB | 109,24 | 1,63 |
| Fernão Pires | Thomas <i>et al.</i> | 78,31 | 1,63 |
| | CTAB | 157,18 | 1,78 |

Utilizando-se o segundo método de extracção de ADN, com 3 % de CTAB no tampão de extracção, verificou-se um aumento da qualidade e pureza do ADN extraído dos mostos de castas tintas (Quadro 1) melhorando, assim, a amplificação por PCR dos SSRs analisados. Segundo DOYLE e DOYLE (1990), o aumento da concentração de CTAB no tampão de extracção pode ser uma alternativa para a separação dos polisacáridos e polifenóis durante a extracção de ADN.

3.2 - Microssatélites (SSR) Nucleares

Os resultados revelaram que foi possível identificar todas as variedades estudadas através do uso de ADN extraído a partir de mostos, uma vez que os tamanhos dos fragmentos dos alelos dos microssatélites, amplificados individualmente por PCR, foram idênticos aos obtidos a partir de ADN de folhas das respectivas castas. Ao analisar o perfil global dos SSRs das onze castas estudadas, verificou-se que o número de alelos correspondente a cada *locus* não variou significativamente, mostrando valores entre 6 (VrZAG79) e 8 (VVMD5 e VVMD7).

Quadro 2 - Tamanho de fragmentos amplificados para cada *locus* (em número de nucleotídeos) a partir de ADN extraído de folhas e mostos das castas brancas (B) e tintas (T)

| Casta | VVMD5 | | VVMD7 | | VVMD27 | | VrZAG62 | | VrZAG79 | | VVS2 | |
|------------------------------|-------|-----|-------|-----|--------|-----|---------|-----|---------|-----|------|-----|
| Alvarinho (B) | 222 | 232 | 239 | 239 | 189 | 189 | 186 | 204 | 249 | 251 | 137 | 153 |
| Fernão Pires (B) | 226 | 240 | 239 | 239 | 183 | 195 | 188 | 194 | 247 | 247 | 147 | 153 |
| Loureiro (B) | 232 | 232 | 249 | 261 | 181 | 181 | 186 | 196 | 247 | 253 | 145 | 153 |
| Malvasia Fina (B) | 226 | 240 | 239 | 257 | 179 | 195 | 188 | 188 | 249 | 253 | 145 | 147 |
| Moscatel Galego (B) | 228 | 236 | 233 | 249 | 179 | 195 | 186 | 196 | 253 | 255 | 135 | 135 |
| Viosinho (B) | 232 | 232 | 239 | 243 | 185 | 189 | 186 | 188 | 245 | 247 | 135 | 153 |
| Aragonez (T) | 236 | 236 | 239 | 253 | 183 | 183 | 196 | 200 | 247 | 251 | 145 | 147 |
| Tinto Cão (T) | 232 | 234 | 239 | 263 | 181 | 185 | 186 | 194 | 247 | 251 | 135 | 135 |
| Touriga Franca (T) | 226 | 228 | 239 | 243 | 181 | 183 | 192 | 194 | 247 | 249 | 145 | 153 |
| Touriga Nacional (T) | 226 | 238 | 239 | 239 | 181 | 189 | 188 | 194 | 247 | 247 | 145 | 151 |
| Cabernet Sauvignon(T) | 232 | 240 | 239 | 239 | 175 | 189 | 188 | 194 | 249 | 249 | 141 | 153 |

No presente estudo, foi obtido elevado sucesso na amplificação dos nove SSR utilizando-se apenas duas reacções PCR Multiplex. É possível visualizar a amplificação obtida nas duas reacções PCR Multiplex (Figura 4) e o perfil, em tamanho, dos 5 SSR utilizados na reacção Multiplex 1 (Figura 5) da casta Touriga Nacional. Para cada SSR, o tamanho dos fragmentos amplificados nos mostos de cada casta pela PCR Multiplex foi idêntico ao obtido por reacção PCR individual (realizada para os 6 SSR) quer dos mostos, quer das folhas das respectivas castas. Estes nove SSR, sendo os seis recomendados pela OIV e os três pelo projecto GRAPEGEN06, são amplamente utilizados para caracterização molecular de castas de videiras por apresentarem um alto grau de polimorfismo.

4. CONCLUSÕES

Em geral, espera-se que um marcador molecular possua um alto conteúdo informativo, sendo capaz de discriminar diferentes alelos num mesmo *locus* e de amostrar o genoma em vários *loci* ao mesmo tempo (capacidade multiplex) detectando o maior número possível de polimorfismos numa única reacção. Portanto, o uso de reacções PCR Multiplex para identificação molecular de castas presentes em mostos monovariais, através da análise dos nove SSRs, poderá ser uma alternativa viável atendendo ao custo, a rapidez e ao trabalho envolvido na obtenção de dados.

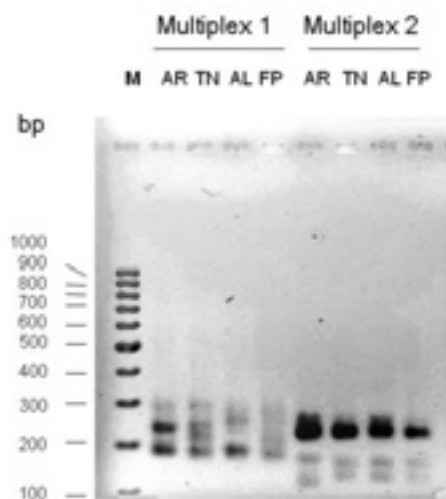


Figura 4 - Gel de agarose (1,2 %) para a verificação da amplificação das reacções PCR Multiplex 1 e 2. M= marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas), AR= Aragonéz, TN= Touriga Nacional, AL= Alvarinho e FP= Fernão Pires.

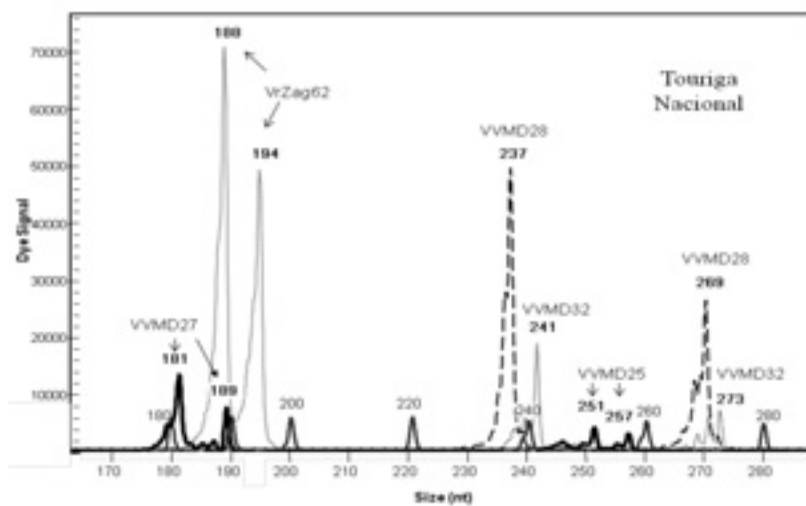


Figura 5 – Perfil dos fragmentos de cinco SSR (VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32 e VrZag62) amplificados pela reacção PCR Multiplex 1, a partir de ADN extraído de mosto da casta Touriga Nacional.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da FCT (PTDC/AGR-ALI/69516/2006). Agradece-se ainda a André Monteiro, Felipe Monteiro, António Clímaco Pereira e Quinta da Boavista pelo fornecimento de uvas de algumas das castas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALEIRAS-COUTO M.M.; EIRAS-DIAS J.E. 2006. Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Anal. Chim. Acta* 563, 283-291.
- BOWERS J.E.; DANGL G.S.; VIGNANI R.; MEREDITH G.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape. *Genome* 39, 628-633.
- BOWERS J.E.; DANGL G.S.; MEREDITH C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite ADN markers for grape. *Am. J. Enol. Viticult.* 50, 243-246.
- CUNHA J.M.; TEIXEIRA SANTOS M.; CARNEIRO L.; FEVEREIRO P.; EIRAS-DIAS J.E. 2009. Portuguese traditional grapevine cultivars and wild vines *Vitis vinifera* L. share morphological and genetic traits. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56, 975-989.
- DOYLE J.J.; DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19, 11-15.
- DOYLE J.J.; DOYLE J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* 12, 13-15.
- HAYASAKA Y.; ADAMS K.S.; POCOCK K.F.; BALDOCK G.A.; WATERS E.J.; HOJ P.B. 2001. Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera* juice pathogen-related proteins. *J. Agr. Food Chem.* 49, 1830-1839.
- LODHI M.A.; YE G.N.; WEEDEN N.F.; REISCH B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *-Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 6-13.
- MONACI F.; BERGAGLI R.; FECARDI S. 2003. Element concentration in Chianti Classico appellation wines. *Trace Elem. Med. Biol.* 17, 45-50.
- NAKAMURA S.; HARAGUCHI K.; MITANI N.; OHTSUBO K.I. 2007. Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *J. Agr. Food Chem.* 55, 10388-10395.
- RAPPA. Wine aroma substances from gas chromatography analysis. In: *Modern Methods of Plant*

- Analysis. LINSKENS H.F.; JACKSON J. (eds). Springer-Verlag, Berlin, 1988, Vol. 6, pp 29-66.
- REVILLA E.; GARCIA-BENEYLEZ E.; CABELLO F.; MARTIN-ORTEGA G.; RYAN J.M. 2001. Value of high performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A.* 915, 53-60.
- SAVAZZINI F.; MARTINELLI L. 2006. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Anal. Chim. Acta* 563, 274-282.
- SEFC K.M.; REGNER F.; TURETSCHKE E., GLÖSSL J.; STEINKELLNER H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42, 367-373.
- SIRET R.; GIGAUD O.; ROSEC J.P.; THIS P. 2002. Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *J. Agr. Food Chem.* 50, 3822-3827.
- THOMAS M.R.; SCOTT N.S. 1993. Microsatellites repeats in grapevine reveal ADN polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86, 985-990.
- THOMAS M.R.; MATSUMOTO S.; CAIN P.; SCOTT N.S. 1993. Repetitive ADN of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86, 173-180.
- WEISING K.; NYBON H.; WOLFF K.; KAHL G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Boca Raton: CRC Press. 2nd, 472 pp.

ACIDOS FENÓLICOS, ALDEÍDOS FENÓLICOS E DERIVADOS FURÂNICOS EM APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO FRANCÊS E AMERICANO

Maria João CABRITA^{1,3}; Helena ROQUE²; Raquel GARCIA³; Cristina BARROCAS DIAS⁴

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo a caracterização de aparas comerciais de carvalho francês e americano do ponto de vista da sua composição fenólica. Assim os ácidos fenólicos (ácido gálico, siringico e vanílico) os aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) e os derivados furânicos (furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural) foram quantificados em amostras comerciais de aparas de carvalho francês e americano com diferentes tamanhos e níveis de queima. Os compostos fenólicos foram extraídos directamente das amostras de madeira e também de soluções de vinho sintético, de forma a avaliarmos as diferenças entre tipos de madeira e níveis de queima.

Os resultados mostram que as aparas de carvalho francês em estudo são mais ricas em compostos fenólicos que as de carvalho americano e que em ambos os casos as aparas que não foram sujeitas a queima são as mais pobres nestes compostos.

PALAVRAS CHAVE: compostos fenólicos, aparas de carvalho.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de aparas de carvalho em enologia é hoje prática corrente, o que torna pertinente o estudo da sua composição. Os compostos fenólicos são um conjunto de compostos com propriedades interessantes nomeadamente, propriedades anti-oxidantes

¹ Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora. Ap 94 7002-554 Évora, Portugal. Email: mjbc@uevora.pt

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Ap 94 7002-554 Évora, Portugal.

³ Aluna do Mestrado de Tecnologia Alimentar da Universidade de Évora.

⁴ Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, CLAV Rua Romão Ramalho 59, 700-617 Évora, Portugal, Centro de Química de Évora (CQE), Portugal.

atribuídas a flavonoides e ácidos cinâmicos (McDONALD *et al.*, 1998) o que torna o conhecimento da composição das madeiras usadas em enologia um possível benefício para indústria. Por outro lado, sabemos que a composição das madeiras está intimamente relacionada com a espécie botânica e a sua origem, mas sobretudo com os processos de maturação e de queima que a madeira sofre durante o seu processamento. A forma e o tamanho das aparas vão por seu lado condicionar os processos de extração dos compostos extraíveis da madeira pelo vinho.

O objectivo deste trabalho foi estudar a composição em ácidos fenólicos (ácido gálico, sirínico e vanílico), aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) e derivados furânicos (furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroxi-metilfurfural) em amostras comerciais de aparas de carvalho francês e americano com diferentes tamanhos e níveis de queima.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

As aparas de madeira utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas por VDS Enologia (tabela 1).

Tabela 1 – Código das amostras de aparas utilizadas

| Aparas de carvalho americano | Aparas de carvalho francês |
|---|---|
| Classic Oak Chips, untoasted – A1 | Classic Oak Chips, untoasted – F1 |
| Toasted Oak Powder – A2 | Toasted Oak Powder – F2 |
| Classic Oak Chips, large size, medium toast - A3 | Classic Oak Chips, large size, medium toast - F3 |
| Classic Oak Chips, large size, heavy toast – A4 | Classic Oak Chips, large size, heavy toast – F4 |

Um vinho sintético (13,8% etanol, 3,2 g/L ácido tartárico) foi engarrafado com 6g/L de cada uma das aparas em estudo, colocado a 20°C durante um mês e analisado. O ensaio foi efectuado em triplicado.

2.2 – Análise por HPLC

2.2.1. Preparação das amostras

SLE - as aparas de madeira foram moídas para eliminar o efeito tamanho. Efec-

tuou-se uma extracção sólido-líquido (1,5g de cada apara, 10 mL de metanol, 3 horas). Os extractos foram filtrados antes de serem injectados. As extracções foram feitas em triplicado.

SS-LLE – as amostras de vinho sintético foram extraídas por extracção líquida-líquida em suporte sólido, usando terra de diatomáceas como suporte (NAVE *et al.*, 2007). Foram feitos cartuchos de 4 g de terra de diatomáceas, nos quais foram adsorvidos 6 mL de amostra. Os compostos fenólicos foram eluídos com sob vácuo com 10 mL acetato de etilo. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas num evaporador rotativo ($T = 30^{\circ}\text{C}$). O resíduo obtido foi redissolvido em 1 mL de solução metanol/água (1:1) e filtrado através de um filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ antes de serem analisados por HPLC-DAD. As amostras foram preparadas em triplicado.

2.2.2. Condições cromatográficas

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida da Hewlett Packard série 1050 equipado com um loop de $20\ \mu\text{L}$, uma bomba quaternária e um detector de fotodiodos (DAD) da HP série 1100.

A coluna utilizada para a separação dos compostos fenólicos foi uma RP Superher® 100, C18 ($250\ \text{mm} \times 4,6\ \text{mm i.d.}, 5\ \mu\text{m}$) (Merck, Alemanha) com précoluna do mesmo material. Os eluentes utilizados foram: solvente A - água/ácido acético (98:2 v/v) e solvente B água/metanol/ácido acético (68:30:2 v/v), com um fluxo de $1\ \text{mL/min}$, de acordo com o seguinte gradiente para o solvente A: de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocrático durante 9 minutos; de 23% a 5% (5 min); de 5% a 0% (3 min); isocrático durante 5 minutos. A detecção dos compostos foi feita a 280, 254 e 320 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com soluções padrão e quantificados utilizando rectas de calibração. Os parâmetros de calibração estão na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de calibração

| Composto | TR ± DP (min) | λ (nm) | equação | r ² |
|---------------------------|------------------|--------|-------------------|----------------|
| Ácido gálico | 6,45 ± 0,01 | 280 | y= 20,914x-19,951 | 0,999 |
| Furfural | 14,20 ± 0,27 | 280 | y= 151,19x-27,452 | 0,999 |
| Ácido vanílico | 25,29 ± 0,21 | 254 | y= 28,333x-1,493 | 0,999 |
| 5-metilfurfural | 28,16 ± 1,31 | 280 | y= 61,76x-7,0062 | 1 |
| Ácido siringico+ vanilina | 31,05 ± 1,51 | 280 | y= 32,313x-3,5718 | 0,999 |
| Seringaldeído | 38,17 ± 0,21 | 320 | y= 29,108x-0,8375 | 0,999 |
| Coniferaldeído | 47,97 ± 0,39 | 320 | y= 49,119x-2,9552 | 0,999 |
| Sinapaldeído | 51,14 ± 0,39 | 320 | y= 35,772x-4,9892 | 0,999 |
| Ácido elágico | 69,34 ± 1,81 | 254 | y= 175,54x-251,73 | 0,998 |

2.3. Análise estatística

Foi efectuada uma análise de variância com teste de comparação de médias de Tukey, a 95% de confiança, usando o SPSS 13.0.

3 – RESULTADOS E DISCUSÃO

Nas tabelas 3 e 4 apresentam-se os resultados obtidos para as amostras das diferentes aparas de carvalho em estudo. Da sua observação ressalta que o total de compostos fenólicos é maior nas aparas de carvalho francês do que nas aparas de carvalho americano, e em ambos os casos as aparas não sujeitas a queima são claramente mais pobres nestes compostos fenólicos.

De entre os ácidos fenólicos o ácido gálico e o ácido elágico são muito abundantes. O ácido gálico apresenta o valor mais elevado nas aparas sujeitas a tosta média, o que pode significar que a temperaturas mais elevadas ele é degradado, chegando a apresentar valores inferiores aos das aparas não sujeitas a queima (GIMENEZ-MARTINEZ *et al.*, 1996). O ácido elágico provém da degradação dos elagitaninos durante o tratamento térmico e da hidrólise dos elagitaninos durante o processo de maturação da madeira (PUECH *et al.*, 1989), o que ajuda a explicar os elevados teores encontrados nas aparas não sujeitas a queima. As aparas de carvalho francês são mais ricas que as de carvalho americano em ácido elágico.

A presença de aldeídos furânicos está relacionada com a termodegradação dos açúcares. Os nossos resultados mostram que as aparas de carvalho francês são mais ricas que as de carvalho americano em aldeídos furânicos. Nas madeiras não sujeitas a queima os teores de furfural, 5-metilfurfural (NABETA *et al.*, 1986) e 5-hidroxi-metilfurfural (MASSON *et al.*, 2000) são geralmente baixos. O nível de queima afecta o teor destes compostos, verificando-se que o teor em furfural aumenta com a intensidade da tosta e o 5-hidroxi-metilfurfural apresenta o valor mais elevado no nível de tosta médio, quer nas aparas de carvalho francês quer nas de carvalho americano.

As aparas de carvalho não sujeitas a tosta apresentam teores baixos de aldeídos fenólicos, o que está de acordo com resultados já publicados (MARCO *et al.*, 1994, CANAS, 2003). O processo de queima a que as aparas são sujeitas origina um aumento do teor destes compostos, mas os aldeídos fenólicos também podem ser termodegrados em ácidos fenólicos e fenóis voláteis (CHATONNET, 1995) o que pode explicar as flutuações encontradas, nas nossas amostras. Alguns autores referem que os aldeídos fenólicos apresentam teores máximos nos níveis médios de queima (CHATONNET *et al.*, 1989) enquanto outros autores afirmam que o seu teor aumenta com o nível de queima (ARTAJONA, 1991).

Table 3 – Compostos fenólicos (mg/100g) das aparas de Carvalho Americano

| Composto | A1 | A2 | A3 | A4 |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Ácido gálico | 35,91 ^a ± 4,16 | 48,83 ^b ± 2,05 | 107,04 ^c ± 6,27 | 54,10 ^b ± 3,34 |
| Ácido vanílico | 2,51 ^a ± 0,83 | 10,01 ^c ± 1,89 | 7,61 ^b ± 0,33 | 11,03 ^c ± 1,59 |
| Ácido siringico+ vanilina | 6,96 ^b ± 3,08 | 52,28 ^b ± 2,04 | 47,82 ^b ± 11,21 | 62,84 ^c ± 3,41 |
| Ácido elágico | 90,66 ^b ± 15,94 | 17,51 ^a ± 2,98 | 172,38 ^d ± 12,85 | 126,83 ^c ± 3,90 |
| 5-OH-metilfurfural ^(*) | 0,53 ^a ± 0,18 | 6,20 ^c ± 1,34 | 13,16 ^d ± 2,55 | 6,09 ^c ± 0,25 |
| 5-metil-furfural | 1,13 ^a ± 0,36 | 1,84 ^a ± 0,10 | 2,60 ^b ± 0,43 | 7,35 ^c ± 0,42 |
| Furfural | 1,13 ^a ± 0,08 | 7,87 ^b ± 0,77 | 12,23 ^c ± 4,12 | 25,58 ^d ± 1,07 |
| Seringaldeído | 4,21 ^a ± 0,36 | 65,61 ^c ± 2,33 | 18,97 ^b ± 0,97 | 65,79 ^c ± 3,67 |
| coniferaldeído | 1,31 ^a ± 0,27 | 69,87 ^c ± 1,94 | 29,77 ^b ± 1,15 | 95,32 ^d ± 5,39 |
| sinapaldeído | 3,26 ^a ± 1,01 | 188,84 ^c ± 5,50 | 35,26 ^b ± 1,14 | 194,54 ^c ± 10,95 |
| Total | 147,62 | 568,85 | 446,84 | 647,46 |

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Table 4 – Compostos fenólicos (mg/100g) das aparas de Carvalho Francês

| Composto | F1 | F2 | F3 | F4 |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Ácido gálico | 69,68 ^b ± 2,19 | 62,02 ^b ± 13,06 | 195,96 ^a ± 2,48 | 19,16 ^a ± 1,50 |
| Ácido vanílico | 4,97 ^a ± 0,60 | 10,62 ^b ± 1,91 | 6,72 ^a ± 2,06 | 15,24 ^a ± 1,02 |
| Ácido siringico+ vanilina | 12,64 ^a ± 0,85 | 68,02 ^b ± 11,65 | 69,98 ^b ± 3,31 | 76,26 ^a ± 3,14 |
| Ácido elágico | 126,16 ^a ± 10,06 | 145,83 ^a ± 19,90 | 212,52 ^a ± 4,85 | 319,67 ^d ± 20,67 |
| 5-OH-metilfurfural ^(*) | 4,79 ^a ± 0,51 | 7,75 ^b ± 2,01 | 23,10 ^a ± 1,10 | 8,41 ^b ± 0,71 |
| 5-metil-furfural | 1,95 ^a ± 0,23 | 8,30 ^b ± 2,20 | 16,06 ^a ± 1,01 | 10,39 ^b ± 2,21 |
| Furfural | 3,82 ^a ± 0,40 | 8,69 ^b ± 1,04 | 25,95 ^a ± 1,55 | 32,30 ^a ± 0,49 |
| Seringaldeído | 4,77 ^a ± 0,43 | 81,85 ^a ± 15,79 | 36,30 ^b ± 0,46 | 209,96 ^a ± 4,14 |
| coniferaldeído | 0,93 ^a ± 0,11 | 80,27 ^a ± 10,69 | 85,03 ^a ± 2,04 | 42,19 ^b ± 4,03 |
| sinapaldeído | 2,03 ^a ± 0,18 | 222,03 ^a ± 27,74 | 148,19 ^b ± 3,22 | 179,48 ^a ± 5,40 |
| Total | 231,75 | 695,37 | 819,77 | 913,06 |

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

Tabela 5 – Compostos fenólicos (mg/L) na solução modelo com aparas de Carvalho Americano.

| Composto | A1 | A2 | A3 | A4 |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ácido gálico | 1.68 ^a ± 0.76 | 1.10 ^a ± 0.11 | 1.53 ^a ± 0.93 | 1.18 ^a ± 0.24 |
| Ácido vanílico | 0.12 ^a ± 0.08 | 0.33 ^a ± 0.03 | 0.20 ^a ± 0.09 | 0.33 ^a ± 0.49 |
| Ácido siringico+ vanilina | 0.36 ^a ± 0.04 | 1.64 ^b ± 0.27 | 0.67 ^a ± 0.06 | 1.57 ^b ± 0.16 |
| Ácido elágico | nd | 0.37 ^a ± 0.06 | nd | 0.32 ^a ± 0.11 |
| 5-OH-metil-furfural ^(*) | 0.05 ^a ± 0.01 | 0.25 ^b ± 0.02 | 0.16 ^b ± 0.04 | 0.22 ^b ± 0.01 |
| Seringaldeído | 0.19 ^a ± 0.08 | 2.69 ^b ± 0.43 | 0.65 ^a ± 0.19 | 2.23 ^b ± 0.15 |
| coniferaldeído | 0.09 ^a ± 0.02 | 2.10 ^b ± 0.35 | 0.61 ^a ± 0.23 | 2.06 ^b ± 0.16 |
| sinapaldeído | 0.19 ^a ± 0.08 | 5.24 ^b ± 0.96 | 0.74 ^a ± 0.37 | 4.14 ^b ± 0.87 |
| total | 2,68 | 13,72 | 4,56 | 12,05 |

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Tabela 6 – Compostos fenólicos (mg/L) na solução modelo com aparas de Carvalho Francês

| Composto | F1 | F2 | F3 | F4 |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Ácido gálico | 1.49± 0.35 | 1.57± 0.35 | 3.63 ^{b±} 0.26 | 0.50± 0.87 |
| Ácido vanílico | 0.19± 0.08 | 0.58 ^{c±} 0.05 | 0.29 ^{ab±} 0.02 | 0.38 ^{abc±} 0.04 |
| Ácido siringico+ vanilina | 0.41± 0.08 | 1.84 ^{b±} 0.13 | 0.99± 0.18 | 2.32 ^{b±} 0.13 |
| Ácido elágico | nd | 0.36 ^{a±} 0.01 | nd | 0.72 ^{b±} 0.08 |
| 5-OH-metil-furfural ^(*) | 0.05± 0.00 | 0.23 ^{b±} 0.01 | 0.44± 0.04 | 0.31 ^{b±} 0.01 |
| Seringaldeído | 0.18± 0.01 | 3.19 ^{b±} 0.06 | 1.19± 0.13 | 5.77 ^{c±} 0.67 |
| coniferaldeído | 0.08± 0.01 | 2.76 ^{b±} 0.06 | 2.62 ^{bc±} 0.18 | 1.17 ^{d±} 0.21 |
| sinapaldeído | 0.16 ^{a±} 0.06 | 7.06 ^{bd±} 0.29 | 4.04 ^{c±} 0.22 | 4.49 ^{bc±} 0.76 |
| total | 2,56 | 17,77 | 13,20 | 15,66 |

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

Nas tabelas 5 e 6 apresentam-se os valores obtidos para os diferentes compostos fenólicos doseados nas diferentes amostras de vinhos sintético. As soluções modelo contendo aparas de carvalho francês apresentam um total de compostos fenólicos mais elevado do que as soluções modelo contendo aparas de carvalho americano. Em ambos os casos os teores de compostos fenólicos extraídos das aparas para as soluções modelo aumentam com o nível de tosta, de acordo com os resultados anteriormente apresentados. O ensaio realizado com as aparas de carvalho americano tosta média apresenta os valores mais baixos, não considerando os ensaios realizados com as aparas não sujeitas a tosta. Os teores elevados de compostos fenólicos obtidos no ensaio com as aparas A2 e F2 estão provavelmente relacionados com a dimensão das mesmas, uma vez que eram as únicas que se apresentavam na forma de pó.

O resultado mais saliente são os baixos teores de ácido elágico encontrados nas soluções modelo

4 – CONCLUSÕES

As aparas de carvalho francês apresentam-se genericamente mais ricas em compostos fenólicos do que as aparas de carvalho americano, salientando-se os teores elevados de ácido elágico que as primeiras apresentam. De entre as amostras estudadas as aparas mais pobres são as que não foram sujeitas a queima apresentando porém teores consideravelmente elevados de ácido gálico e de ácido elágico.

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Embora de forma genérica se possa afirmar que o aumento do nível de queima favorece a formação de ácidos e aldeídos fenólicos e de derivados furânicos, para alguns compostos é notório que quando o nível de queima aumenta o seu teor diminui, o que pode estar relacionado com processos de termodegradação.

Os resultados obtidos com o ensaio efectuado com as soluções modelo são consistentes, com os resultados obtidos para as aparas salientando-se o facto de que as amostras em pó A2 e F2 potenciarem a extracção dos compostos pela solução modelo. Estes resultados demonstram a importância de se conhecerem melhor a cinética de extracção dos compostos existentes nas madeiras de carvalho na forma de aparas, utilizadas em enologia.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTAJONA, J., 1991. Caracterisation del roble según su origen y grado de tostado, mediante la utilización de GC y HPLC. *Viticultura/Enología Profesional*, **14**, 61-72.
- CANAS, S., 2003. Estudo dos compostos extraíveis de madeira (Carvalho e Castanheiro) e dos processos de extracção na perspectiva do envelhecimento em Enologia. 303 p. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, UTL-ISA, Lisboa
- CHATONNET, P., BOIDRON, J.N., PONS, M., 1989. Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2. partie: Évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *Conn. Vigne Vin*, **23**, 223-250.
- CHATONNET P., 1995. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fût de chêne. 268 p. Thèse Doctorat. UFR Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, Bordéus.
- GIMENEZ-MARTINEZ R., GARCIA DE LA SERRANA H.L., VILLALON MIR M., GRANADOS J.Q., MARTINEZ M.C.L., 1996. Influence of wood heat treatment, temperature and maceration time on vanillin, syringaldehyde, and gallic acid contents in oak wood and wine spirit mixtures. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 441-446.
- MARCO J., ARTAJONA J., LARRECHI M.S., RIUS F.X., 1994. Relationship between geographical origin and chemical composition of wood for oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 192-200
- MASSON E., BAUMES R., MOUTOUNET M., PUECH J.-L., 2000. The effect of kiln-drying on the levels of ellagitannins and volatile compounds of European oak (*Quercus petraea* Liebl.) stave wood. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 201-214
- McDONALD MS, HUGHES M, BURNS J, LEAN MEJ, MATTHEWS D, CROZIER A. 1998,

Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 46:368–375

NABETA K., YONEKUBO J., MIYAKE M., 1986. Analysis of volatile constituents of european and japanese oaks. *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 921-927.

NAVE, F.; CABRITA, M.J.; COSTA C. 2007, The Use of Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction in the Analysis of Polyphenols in Wine. *Journal of Chromatogr. A*, 1169 23–30

PUECH J.-L., ROBERT A., MOUTTET B., 1989. Evolution of oak wood lignin subjected to flash hydrolysis. *Holzforschung*, **43**, 235-238.



ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ALGUMAS CASTAS TINTAS DA REGIÃO DO DÃO E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO FENÓLICA

António M. JORDÃO ^{1,2*}; Sylvie SIMÕES ²; Fernando J. GONÇALVES ²;
Ana C. CORREIA ²

RESUMO

O presente trabalho teve por objectivo estudar a actividade antioxidante nas diferentes fracções do bago de uva (película, polpa e grainha) de algumas castas tintas produzidas na região do Dão (*Jaen*, *Touriga Nacional* e *Tinta Roriz*). Para tal, procedeu-se inicialmente a um estudo comparativo de diferentes metodologias de extracção para a obtenção de extractos. Nas diferentes fracções do bago de uva, avaliou-se a actividade antioxidante total e estabeleceram-se correlações com a respectiva composição fenólica. Das várias combinações de solventes utilizados constatou-se a obtenção de valores mais elevados de actividade antioxidante nos extractos obtidos a partir de macerações sucessivas com metanol e acetona. Para todas as castas objecto de estudo, obtiveram-se valores mais elevados de actividade antioxidante nas grainhas, seguindo-se as películas e por último a polpa. Ao mesmo tempo obtiveram-se valores de actividade antioxidante similares, nas películas em todas as castas estudadas. Porém, considerando a globalidade do bago de uva, foi na casta *Tinta Roriz* onde se obtiveram valores da actividade antioxidante mais elevados. Foram ainda obtidas correlações elevadas entre a actividade antioxidante e os teores em taninos totais quantificados nas 3 castas estudadas.

Palavras-chave: Actividade antioxidante, composição fenólica, extracção, uvas.

1 - INTRODUÇÃO

Aos compostos fenólicos estão associados um conjunto de benefícios importantes sobre a saúde humana, nomeadamente, contribuindo para a redução dos riscos de arteriosclerose, de doenças coronárias, na prevenção da oxidação das lipoproteínas de baixa

¹ Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde do Instituto Politécnico de Viseu, Campus Politécnico, 3504-510 Viseu, Portugal.

⁽²⁾ Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Alimentares, Estrada de Nelas, Quinta da Alagoa, Ranhados, 3500-606 Viseu, Portugal. *E-mail: antoniojorao@esav.ipv.pt

densidade, assim como para o decréscimo de patologias de origem cancerígena (FRANKEL *et al.* 1993; TAPIERO *et al.* 2002). Vários trabalhos têm evidenciado a existência de uma elevada relação entre os vários compostos fenólicos e a capacidade antioxidante presente nas uvas e nos vinhos (YILMAZ e TOLEDO 2004; ORAK 2007).

Os teores e o tipo de compostos fenólicos, assim como a actividade antioxidante associada, existente nos vinhos, é influenciada por vários factores, como sejam: o tipo de casta, as condições edafoclimáticas, as técnicas vitícolas e os processos envolvidos na elaboração dos vinhos, nomeadamente, ao nível das técnicas de vinificação, de clarificação e das condições e tipo de conservação utilizadas (FAITOVÁ *et al.* 2004; PÉREZ-MAGARIÑO e GONZÁLEZ-SAN-JOSÉ 2006; CORREIA *et al.* 2007; GONÇALVES e JORDÃO 2009 a; 2009 b).

Nos últimos anos vários trabalhos têm sido efectuados com o objectivo de avaliar a actividade antioxidante das uvas, não só em países com grande actividade vitivinícola (MUÑOZ-ESPADA *et al.* 2004) como também, em países com um menor impacto desta actividade económica (POUDEL *et al.* 2008). No entanto, no caso de Portugal, o estudo do potencial antioxidante existente nas nossas castas, tem até ao presente, sido ainda bastante limitado. A avaliação da actividade antioxidante das uvas, poderá ser mais uma importante informação, quando se pretende obter vinhos com elevada longevidade e ‘resistência’ aos fenómenos oxidativos. Assim, enquadrado num trabalho mais amplo que tem por objectivo avaliar a actividade antioxidante das uvas e dos vinhos elaborados a partir das principais castas tintas utilizadas na região do Dão, o presente trabalho teve os seguintes 2 objectivos: efectuar um estudo comparativo de várias metodologias de preparação das amostras com vista à obtenção de extractos e ainda avaliar a actividade antioxidante de 3 castas tintas e simultaneamente relaciona-la com a composição fenólica.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas uvas das castas, *Touriga Nacional*, *Tinta Roriz* e *Jaen*, provenientes de uma vinha da região do Dão, tendo sido colhidas amostras de 100 bagos (em triplicado) à maturação tecnológica no ano de 2008. Efectuou-se uma análise comparativa de vários métodos de extracção de compostos fenólicos, com vista à posterior de-

terminação da actividade antioxidante para cada uma das fracções do bago de uva. Os procedimentos resumidos de cada um dos métodos de extracção são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Métodos estudados (solventes e tempos de extracção) para a obtenção de extractos para a determinação da actividade antioxidante nas uvas.

| BOURZEIX <i>et al.</i> (1986) | SUN <i>et al.</i> (1996) | FERREIRA <i>et al.</i> (2002) | FERREIRA <i>et al.</i> (2002) |
|---------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|
| Método M1 | Método M2 | Método M3 | Método M4 |
| Metanol/Água (80/20) 4 horas | Metanol/Água (80/20) 3 horas | n-Hexano 15 minutos | Acetona/Água (60/40) 1 hora |
| Metanol/Água (50/50) 4 horas | Acetona/Água (75/25) 3 horas | Metanol/Ác. acético (98/2) 15 minutos | – |
| Água 4 horas | – | – | – |
| Acetona/Água (75/25) 1 hora | – | – | – |

Para a determinação da actividade antioxidante total dos extractos obtidos a partir das uvas, recorreu-se a 2 métodos, DPPH e ABTS, seguindo as condições descritas por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e RE *et al.* (1999), respectivamente. Efectuou-se ainda uma análise de variância, através da utilização do teste LSD com o objectivo de comparar os valores médios obtidos (nível de significância de 5%), tendo-se para tal recorrido o programa SPSS (versão 11.0).

3 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na Figura 1, apresentam-se os valores da actividade antioxidante na película, polpa e grainha da casta *Jaen*, de acordo como os métodos de extracção estudados.

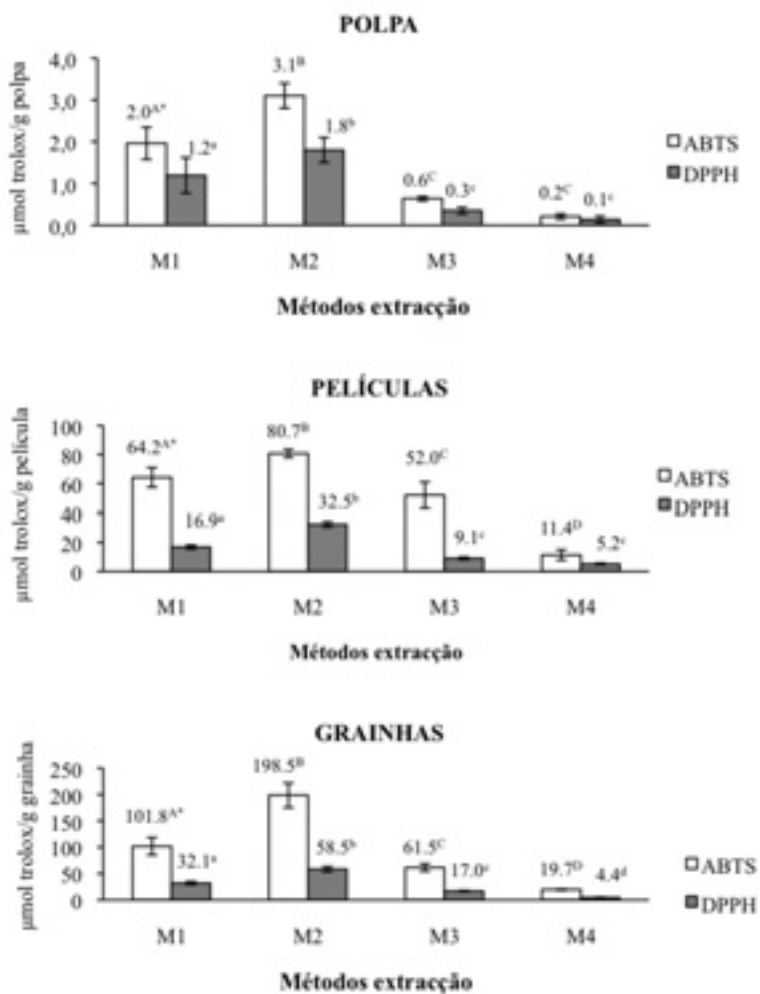


Figura 1 – Valores da actividade antioxidante (métodos DPPH e ABTS) nas películas, polpa e grainhas da casta *Jaen*, em função das várias metodologias de extração estudadas (legenda ver quadro 1). * Valores médios (3 repetições) com a mesma letra/tamanho não são significativamente diferentes.

Verificou-se que para todas as fracções do bago de uva, e para os dois métodos de determinação da actividade antioxidante utilizados, a metodologia de extracção baseada em macerações sucessivas com metanol e acetona (método M2), tendo por base as condições descritas por SUN *et al.* (1996), foi a que permitiu a quantificação de valores da actividade antioxidante significativamente mais elevados (Figura 1). Assim, tendo por base estes resultados, podemos considerar que entre os métodos analisados, o método M2 foi o que permitiu obter uma maior extracção de compostos fenólicos e consequentemente a quantificação de valores mais elevados de actividade antioxidante.

Por outro lado, os valores mais elevados de actividade antioxidante foram obtidos quando se recorreu ao método ABTS em detrimento do método DPPH. Esta conclusão está de acordo com resultados obtidos anteriormente em vinhos por OLIVEIRA *et al.* (2008). De acordo com ARTS *et al.* (2003), os valores da actividade antioxidante variam de acordo com o método utilizado, visto que cada método apresenta uma afinidade diferente em função dos compostos fenólicos presentes no meio. Ainda de acordo com estes autores, existe uma maior afinidade por parte do método ABTS, na determinação da actividade antioxidante das uvas.

A figura 2 apresenta os valores de actividade antioxidante para diferentes fracções do bago de uva das castas *Touriga Nacional*, *Tinta Roriz* e *Jaen*, à maturação tecnológica, recorrendo ao método de extracção M2. Pela análise da figura, constata-se que não foram obtidos valores significativamente diferentes de actividade antioxidante no caso das películas, entre as três castas objecto de estudo. No caso da polpa, obtiveram-se valores significativamente mais elevados nas castas *Tinta Roriz* e *Jaen*, enquanto que nas grainhas foi a casta *Tinta Roriz* aquela que apresentou valores mais elevados, seguindo-se a *Touriga Nacional* e o *Jaen*.

Relativamente à actividade antioxidante nas diferentes fracções do bago, foram nas grainhas que se obtiveram os valores mais elevados (de 198.5 a 445.1 $\mu\text{mol trolox/g}$ grainha, método ABTS), seguindo-se a película (72.0 a 80.7 $\mu\text{mol trolox/g}$ película, método ABTS) e por último a polpa (1.6 a 3.1 $\mu\text{mol trolox/g}$ polpa, método ABTS). Esta tendência foi observada em todas as castas objecto de estudo e independentemente do método de determinação da actividade antioxidante utilizado. Esta distribuição está associada ao facto de serem nas grainhas, onde se encontram os valores mais elevados

de compostos fenólicos comparativamente às restantes fracções de bago de uva. Segundo ESCRIBANO-BAILÓN *et al.* (1992), a presença de valores mais elevados das formas monoméricas e oligoméricas das procianidinas nas grainhas comparativamente aos valores existentes nas películas, justifica a diferença de valores da actividade antioxidante nesta fracção do bago de uva. Saliente-se no entanto, o facto de alguns autores terem encontrado em algumas castas, valores mais elevados de actividade antioxidante nas películas, comparativamente aos valores doseados nas grainhas, sendo esta diferença explicada talvez pelo facto de algumas das castas estudadas apresentarem elevados conteúdos em antocianas totais, fenóis totais e flavonois totais nas películas (POUDEL *et al.* 2008). Ainda segundo GUENDEZ *et al.* (2005), é a procianidina B1 presente nas grainhas, que é atribuído um maior peso na actividade antioxidante quantificada geralmente nas grainhas.

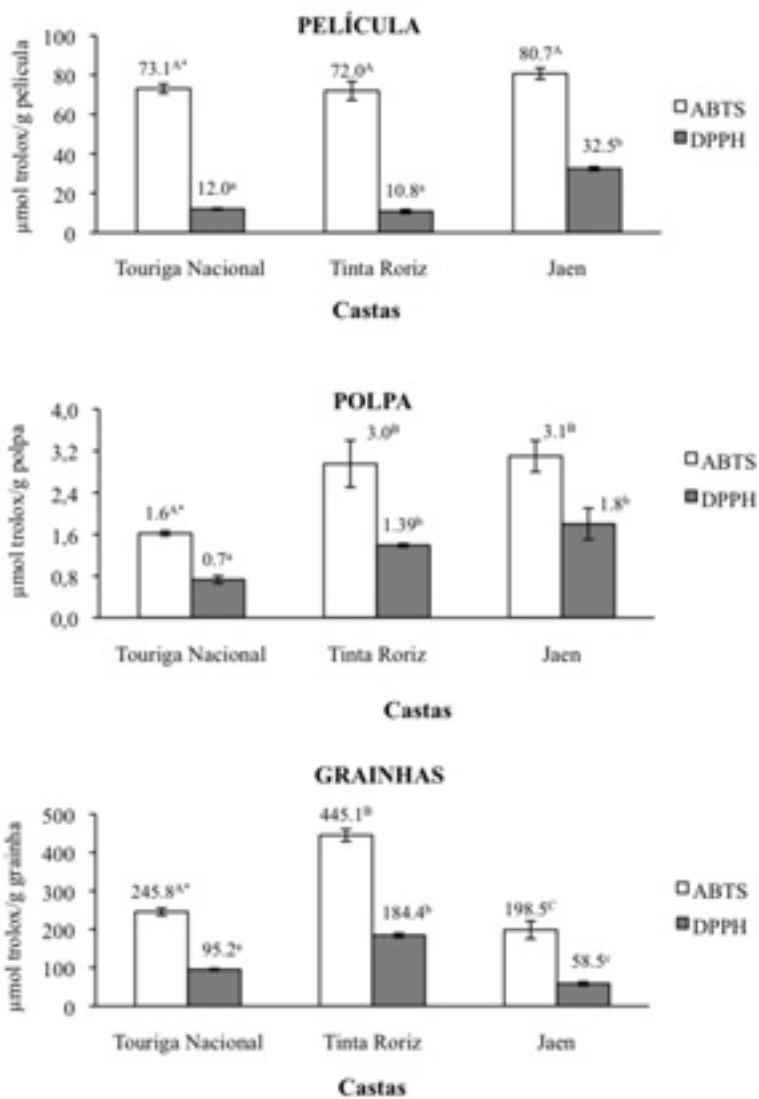


Figura 2 – Valores médios da actividade antioxidante total para as várias partes do bago de uva à maturação tecnológica, nas 3 castas tintas estudadas utilizando dois métodos (ABTS e DPPH). * Valores médios (3 repetições) com a mesma letra/tamanho não são significativamente diferentes.

Os valores da actividade antioxidante quantificada no total do bago de uva (Quadro 2), apontam para a casta *Tinta Roriz*, como aquela que apresenta os valores significativamente mais elevados, seguida da casta *Touriga Nacional* e *Jaen*. Os estudos publicados sobre a actividade antioxidante em várias castas de diversos países, apresentam no geral uma grande variabilidade de valores, sendo normalmente a casta, um dos factores que mais influencia os valores da actividade antioxidante (BOZAN *et al.* 2008; POUDEL *et al.* 2008).

Quadro 2 – Valores médios da actividade antioxidante total considerando o somatório das 3 fracções do bago de uva, nas 3 castas estudadas.

| Actividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox/g bago}$) | Touriga Nacional | Tinta Roriz | Jaen |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Método ABTS | 320.5 ^{A*} ($\pm 11,9$) | 520.1 ^B ($\pm 20,7$) | 282.3 ^C ($\pm 26,3$) |
| Método DPPH | 107.9 ^A ($\pm 2,9$) | 196.5 ^B ($\pm 6,0$) | 92.8 ^C ($\pm 5,9$) |

No Quadro 3, são apresentados os valores médios obtidos ao nível da composição fenólica geral das castas estudadas. No geral, os valores obtidos foram similares, tendo no entanto a casta *Tinta Roriz*, apresentado os valores médios mais elevados em termos dos teores em taninos totais (113.8 mg/L) e do índice de polifenóis totais (60.7).

Quadro 3 – Valores médios da composição fenólica geral à maturação, nas 3 castas estudadas.

| | Touriga Nacional | Tinta Roriz | Jaen |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Antocianinas totais (mg/100g bagos) | 112.5 ^{A*} ($\pm 2,7$) | 87.8 ^B ($\pm 2,1$) | 120.7 ^A ($\pm 6,1$) |
| Taninos totais (mg/100g bagos) | 73.6 ^A ($\pm 8,0$) | 113.8 ^B ($\pm 3,1$) | 72.2 ^A ($\pm 3,0$) |
| Índice de Polifenóis totais (d.o.x100) | 45.4 ^A ($\pm 3,6$) | 60.7 ^B ($\pm 2,1$) | 59.1 ^B ($\pm 4,5$) |

A actividade antioxidante presente nas uvas e vinhos está intimamente associada aos teores em compostos fenólicos existentes. De uma forma geral, existem elevadas correlações entre os teores em compostos fenólicos e a actividade antioxidante existente

* Valores médios (3 repetições) seguidos da mesma letra para a mesma linha não são significativamente diferentes.

nas uvas. No entanto, as correlações não são independentes do tipo de compostos fenólicos que se estejam a considerar. Assim, enquanto que alguns autores apresentam elevadas correlações entre a actividade antioxidante e os teores em antocianinas totais (KALT *et al.* 1999), outros referem que a actividade antioxidante está mais associada ao conteúdo global dos teores em compostos fenólicos existentes, do que a um grupo de compostos fenólicos em particular, como é o caso das antocianinas (ARNOUS *et al.* 2002; ORAK *et al.* 2007). Exemplo desta segunda situação é apresentado por exemplo na casta *Gewürtztraminer*, por ORAK *et al.* (2007). Assim, embora esta casta apresente baixos valores de antocianinas, verifica-se uma elevada riqueza em outros compostos fenólicos, o que se traduz consequentemente em valores elevados de actividade antioxidante. Pela análise do Quadro 4, é possível verificar elevadas correlações entre a actividade antioxidante e os teores em taninos totais e o índice de polifenóis totais. Estes resultados, estão de acordo com os valores obtidos por outros autores em uvas e vinhos (ARNOUS *et al.* 2002; KALLITHRAKA *et al.* 2005; ORAK *et al.* 2007).

Quadro 4 – Coeficientes de correlação total entre a actividade antioxidante nas diferentes fracções do bago de uva e a composição fenólica quantificada nas 3 castas estudadas.

| Parâmetros | Coeficientes de correlação (R ²) | |
|--------------------------|--|------|
| | Métodos | |
| | ABTS | DPPH |
| Antocianinas totais | 0.34 | 0.40 |
| Taninos totais | 0.72 | 0.70 |
| Índice Polifenóis totais | 0.61 | 0.62 |

4 – CONCLUSÕES

Considerando as 3 castas tintas estudadas, verificou-se que no geral à excepção das grânhas (onde se quantificaram os valores mais elevados), todas as castas objecto de estudo evidenciaram valores próximos de actividade antioxidante total em particular nas películas. Porém, ao se considerar o total dos valores da actividade antioxidante quantificado nas três fracções do bago de uva, os resultados apontam para que seja a casta *Tinta Roriz* a que apresenta valores finais mais elevados de actividade antioxidante relativamente às restantes castas estudadas.

Os resultados contribuem para aprofundar o conhecimento do potencial antioxidante das 3 castas estudadas, e como tal fornecer mais informação que poderá ser utilizada no processo de vinificação destas castas, nomeadamente ao nível das opções a tomar durante o processo de maceração, com vista à produção de vinhos com maior capacidade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNUS A.; MAKRIS D.P.; KEFALAS P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.* 15: 655-665.
- ARTS M.J.T.J.; DALLINGA J.S.; VOSS H.P.; HAENEN G.R.; BAST A.A. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.* 80: 409-414.
- BOZAN B.; TOSUN G.; ÖZCAN D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chem.* 109: 426-430.
- BOURZEIX M.; WEYLAND D.; HEREDIA N. (1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres de la vigne. *Bull. O.I.V.* 669-670: 1175-1254.
- BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER M.E.; BERSET C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28: 25-30.
- CORREIA D.; GONÇALVES F.; DE MARI A.; JORDÃO A.M. (2007). Aplicação de diferentes tipos de taninos enológicos: Incidência sobre as características cromáticas e a actividade antioxidante dos vinhos tintos. *Actas do 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, vol.2: 144-151.
- ESCRIBANO-BAILÓN T.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ Y.; RIVAS-GONZALO J.C.; SANTOS-BUELGA C. (1992). Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety tinta del país grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1794-1799.
- FAITOVÁ K.; HEJTMÁNKOVÁ A.; LACHMAN J.; PIVEC V.; DUDJAK J. (2004). The contents of total polyphenolic compounds and trans-resveratrol in white Riesling originated in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.* 22: 215-221.
- FERREIRA D.; GUYOT S.; MARNET N.; DELGADILLO I.; RENARD C.; COIMBRA M.A. (2002). Composition of Phenolic Compounds in a Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after Sun-Drying. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4537-4544.
- FRANKEL E.N.; KANNER J.; GERMAN J.B.; PARKS E.; KINSELLA J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341: 454-457.
- GONÇALVES F.J. e JORDÃO A.M. (2009 a). Changes in antioxidant activity and proanthocyanidin fraction of red wine aged in contact with Portuguese (*Quercus pyrenaica* Willd.) and American (*Quercus alba* L.) oak wood chips. *Ital. J. Food Sci.* 21: 51-64.
- GONÇALVES F.J. e JORDÃO A.M. (2009 b). Influence of different commercial fining agents on

- proanthocyanidin fraction and antioxidant activity of a red wine from baga grapes. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 43: 111-120.
- GUENDEZ R.; KALLITHRAKA S.; MAKRIS D.P.; KEFALAS P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. *Food Chem.* 89: 1-9.
- KALLITHRAKA S.; MOHDALVA A.A.A.; MAKRIS D.P.; KEFALAS P. (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* L.): association with antiradical activity. *J. Food Comp. Anal.* 18: 375-386.
- KALT W.; FORNEY C.F.; MARTIN A.; PRIOR R. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4638-4644.
- MUÑOZ-ESPADA A.C.; WOOD K.V.; BORDELON B.; WATKINS B.A. (2004). Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6779-6786.
- OLIVEIRA C.M.; FERREIRA A.C.S.; DE PINHO P.G.; SILVA A.M.S. (2008). New Qualitative Approach in the Characterization of Antioxidants in White Wines by Antioxidant Free Radical Scavenging and NMR Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10326-10331.
- ORAK H.H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenol-oxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Sci. Hortic.* 111: 235-241.
- POUDEL P.R.; TAMURA H.; KATAOKA I.; MOCHIOKA R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two native to Japan. *J. Food Comp. Anal.* 21: 622-625.
- PÉREZ-MAGARIÑO S. e GONZÁLEZ-SANJOSÉ M. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* 96: 197-208.
- RE R.; PELLEGRINI N.; PROTEGGENTE A.; PANNALA A.; YANG M.; RICE-EVANS C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- SUN B.S.; SPRANGER M.I.; RICARDO-DA-SILVA J.M. (1996). Extraction of grape seed pro-cyanidins using different organic solvents. *Polyphenols Communications* 96, Bourdeaux, France.
- TAPIERO H.; TEW K.D.; NGUYEN B.A.G.; MATHÉ G. (2002). Polyphenols: do they play a role in prevention of human pathologies?. *Biomed. Pharm.* 56: 200-207.
- YILMAZ Y. e TOLEDO R.T. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 422-433.



COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS DE UVAS SECAS EM CÂMARA COM TEMPERATURA CONTROLADA DA CASTA PEDRO XIMÉNEZ

Maria P. SERRATOSA¹; Ana MARQUEZ¹; Azahara LOPEZ-TOLEDANO¹; Julieta MERIDA¹; Manuel MEDINA¹

RESUMO

Foi estudada a secagem das uvas de cv. Pedro Ximenez numa câmara com temperatura controlada entre 40°C e 50°C. Comparada com a secagem tradicional ao sol, a 50° C a câmara de secagem reduz o tempo de secagem em cerca de 40%. As alterações nos compostos fenólicos também foram estudadas durante o processo. Na ausência de reacções a secagem deve aumentar a concentração de todos os compostos devido ao efeito de evaporação de água a partir das uvas. Contudo, alguns fenóis podem estar presentes em diferentes tipos de reacções incluindo as reacções de escurecimento não enzimáticas e/ou autooxidação e reacções de oxidação enzimática envolvendo polifenoloxidades ou peroxidases e hidrólises. Por conseguinte, as concentrações finais de alguns compostos fenólicos representam um equilíbrio entre ganhos e perdas. Geralmente, os compostos fenólicos aumentam as suas concentrações durante o processo de secagem, contudo estes aumentos foram inferiores ou superiores ao esperado, como resultado do efeito da reacção particular de cada composto.

Palavras chave: compostos fenólicos, vinhos doces, secagem.

1 – INTRODUÇÃO

Os vinhos doces de Pedro Ximenez produzidos no sul de Espanha têm esta designação porque são obtidos a partir de uvas com o mesmo nome. Para o processo de produção, as uvas são desidratadas ao sol para atingirem concentrações de açúcar próximas de 450 g/L, produzindo vinhos extremamente doces. A secagem tradicional por exposição ao sol é um método que não requer muito equipamento, embora o custo de produção para a colocação das uvas e para a operação de viragem periódica destas seja mais elevado. Contudo, este método depende muito das condições climáticas de cada ano, que também afectam a duração específica do processo. As uvas secas através deste

¹ Dpto. Química Agrícola y Edafología. Edificio Marie Curie. Campus de Rabanales. Crta. N-IVa, Km 396. 14014 Córdoba. *e-mail*: vitenol@uco.es

processo estão sujeitas a riscos de deterioração, resultantes principalmente da contaminação por insectos, danos físicos provocados pela chuva, deterioração da cor devido à radiação solar intensa e o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas. Recentemente foram desenvolvidos vários sistemas mecânicos de secagem (Pangavhane *et al.*, 2002).

A substituição tecnológica do processo tradicional de secagem das uvas Pedro Ximenez ao sol, pelo processo de secagem em câmaras em condições controladas revelou-se vantajosa. O processo de secagem não estaria dependente das condições climáticas de cada ano, sendo possível escolher a temperatura e grau de humidade nas câmaras para minimizar a formação de OTA (ocratoxina). Além disso, este método é mais rápido e reduz o tempo de secagem, porque mantém uma temperatura constante ao longo de todo o processo. Contudo, a alteração no processo de secagem das uvas deve considerar a grande aceitação dos vinhos doces de Pedro Ximenez obtidos a partir de uvas desidratadas ao sol, com uma produção anual completamente esgotada antes de sair para o mercado.

Este trabalho estuda a influência da temperatura na percentagem de secagem das uvas *cv.* Pedro Ximenez em câmaras sob condições controladas, assim como as alterações nos compostos fenólicos durante o processo de transformação em passas das uvas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Delineamento experimental de secagem

As uvas de Pedro Ximenez foram vindimadas na região de Montilla-Moriles (Sul de Espanha). Na investigação foram distribuídos uniformemente dois lotes de uvas com 6 kg cada (14 Kg/m²) numa única camada e secos numa câmara a uma temperatura de 40 e 50°C respectivamente. A investigação foi efectuada em triplicado para cada temperatura. As amostras foram recolhidas periodicamente e foi medida a perda de peso das uvas. A concentração de açúcares redutores (medido em °Brix) foi utilizada como critério de monitorização do processo. A secagem foi concluída quando a concentração de açúcar atingiu cerca de 450 g/L.

No laboratório, as uvas foram esmagadas e posteriormente prensadas numa prensa vertical semelhante às utilizadas a nível industrial. A pressão máxima atingida em cada ciclo de prensagem foi de 300 bar, e cada lote de uvas foi prensado em três ciclos. Os mostos obtidos foram centrifugados a 3000 rpm e submetidos a determinações diferentes.

2.2 – Extracção de compostos fenólicos

Um volume de mosto de 25 mL foi ajustado ao pH 7 com 0.1M NaOH. A amostra foi passada por um cartucho Sep-Pak C18, com 900 mg de enchimento (Long Body Sep-Pak Plus; Waters Associates; Milford, Massachusetts) que foi previamente activado com 8 mL de metanol e lavado com água destilada, que foi ajustado ao pH 7 com NaOH (Jaworski and Lee, 1987). O cartucho foi diluído em 8 mL de água com pH 7. Este volume, além do volume obtido como resultado da passagem da amostra previamente à diluição, foi utilizado para determinação da fracção de ácidos fenólicos. Após o pré acondicionamento do cartucho com 2 mL de água com pH 2, a fracção flavon-3-ol foi diluída em 8 mL de 16% acetoneitrilo em água com pH 2 (Oszmianski *et al.*, 1988). A fracção de flavonol foi diluída em 10 mL de metanol. Estas três fracções recolhidas foram concentradas e passadas por um filtro de 0.45 µm de tamanho dos poros para injeção num instrumento Spectra-Physics (San Jose, CA) P4000 HPLC.

2.3 – Identificação e análise por HPLC

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação com os tempos de retenção dos padrões e espectros de UV obtidos por HPLC Dyode Array (Spectra-Physics UV6000LP) e cálculo dos índices de absorção de UV após coinjecção das amostras e dos padrões (Lopez-Toledano *et al.*, 2007). A identificação dos compostos foi confirmada pela análise HPLC/ESI-MS (TermoQuest Finnigan AQA espectrómetro de massa quadropolar. As normas comerciais foram adquiridas em Sigma-Aldrich Chem. Co. (Madrid, Espanha) e Extrasintese Co. (Genay, França). Os ácidos caftárico e cutárico foram isolados pelo método descrito por Singleton *et al.* (1998). Os valores de pureza foram de 95-99%. Cada composto foi quantificado por comparação com a curva de calibração obtida com o valor comercial correspondente, à excepção do ácido caftárico e do feftárico que foram quantificados como cafeíco, p-cumárico e ferílico respectiva-

mente e as procianidinas que foram quantificadas como catequinas. As análises foram efectuadas numa coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5- μ m tamanho das partículas) utilizando 2% de ácido fórmico aquoso e acetonitrila como fase móvel do fluxo volumétrico de 1mL/min e detecção a 280 nm (ácidos fenólicos e fracções de flavon-3-ol), 315 nm (ésteres de ácido hidrocinnâmico) e 360 nm (flavonóis). As fases de diluição foram as seguintes: diluição gradiente entre 5 a 10% CH₃CN em 25 min, diluição gradiente acima de 20% CH₃CN em 10 min, diluição gradiente acima de 30% CH₃CN em 10 min, diluição gradiente acima de 100% CH₃CN em 15 min e diluição isocrática durante 10 min.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As uvas de Pedro Ximenez utilizadas nesta investigação tinham uma concentração inicial de açúcares redutores de 190 g/L. A figura 1 mostra as curvas de secagem das uvas nas temperaturas estudadas. As curvas representam a concentração de humidade

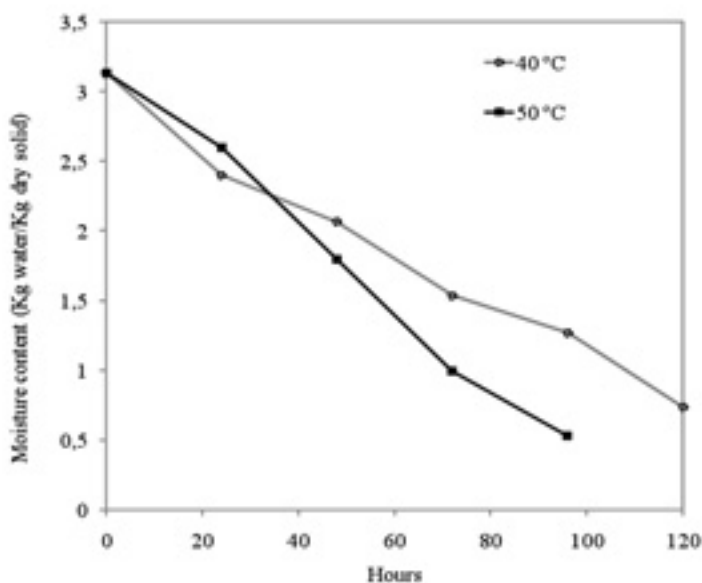


Figure 1 - Drying curves of grapes dried at 40 and 50 °C

(Kg H₂O/Kg sólido, seco) *versus* tempo de secagem. Como esperado, a taxa de secagem foi maior na temperatura mais elevada. A concentração de humidade final das uvas foi de 0.73 Kg água/Kg sólido seco a 40 °C e 0.53 kg água/Kg sólido seco a 50° C. Neste ponto, as concentrações de açúcares redutores foram de 420 g/L e 435.3 g/L a 40 °C e 50 °C respectivamente, os valores aumentaram devido ao factor 2.1 na temperatura anterior e 2.3 nesta última. Este aumento da concentração de açúcares pode ser utilizado como referência do processo de concentração provocado pela perda de água.

Durante o processo de secagem, na ausência de reacções, as concentrações de compostos fenólicos podem aumentar por efeito da evaporação de água a partir das uvas. Contudo, alguns fenóis podem estar presentes em diferentes tipos de reacções incluindo acastanhamento não enzimático (reacções de Maillard e/ou autooxidação) e oxidação enzimática envolvendo oxidases polifenólicas ou peroxidases (Macheix *et al.*, 1991). É também conhecido que alguns derivados flavan-3-ol com elevado peso molecular podem ser hidrolizados em compostos fenólicos com baixo peso molecular (Timberlake and Bridle, 1976; Haslam, 1980; Dallas *et al.*, 1995 y 2003). A figura 2 mostra as alterações em ácidos fenólicos (mg/L) durante o processo de secagem a 40 e 50°C. O ácido gálico foi o único ácido quantificado pois os outros ácidos fenólicos foram inferiores ao limite de quantificação.

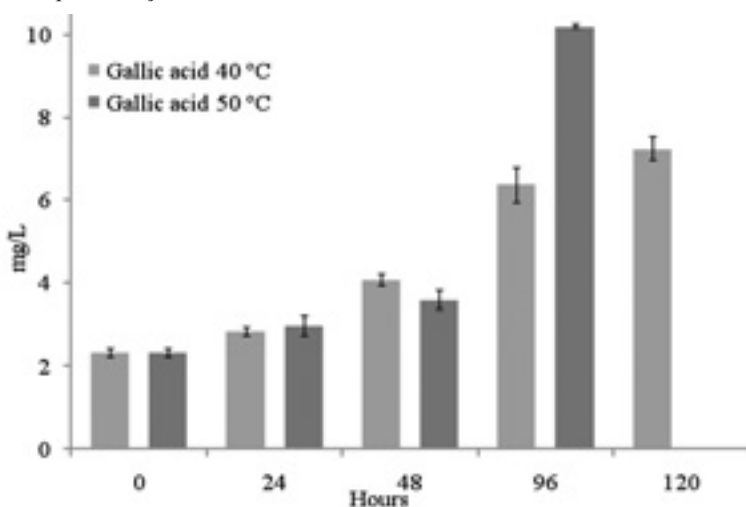


Figure 2 - Changes in gallic acid during grape-drying at 40 and 50 °C

A concentração inicial de ácido gálico era de 2.33 mg/L, no final do processo a 40°C este valor aumentou para 7.24 mg/L, enquanto a 50°C atingiu 10.2 mg/L multiplicando a concentração deste ácido por 3.11 e 4.38 respectivamente. Em ambos os casos o aumento da concentração foi superior ao correspondente ocorrido nos açúcares, como resultado da perda de água, o que sugere um aumento adicional deste composto como resultado da hidrólise dos compostos que o contenham.

A figura 3 mostra as alterações na concentração de ésteres de ácidos hidrocinâmicos durante o processo de secagem a 40 e 50°C. Como se pode observar, a 40°C *cis* isómeros de ácidos cutárico e caftárico não foram detectados, enquanto a 50°C todos os isómeros foram detectados. Em geral, os compostos encontrados em concentrações elevadas eram *trans* isómeros de ácido caftárico, que atingiu valores de 2 mg/L em ambas as temperaturas. Nenhum dos compostos acima mencionados aumentou a concentração em valores comparáveis aos do açúcar. No final do processo a maioria dos compostos foram encontrados em maiores concentrações a 40°C do que a 50°C, mostrando que a temperatura elevada favorece a sua degradação.

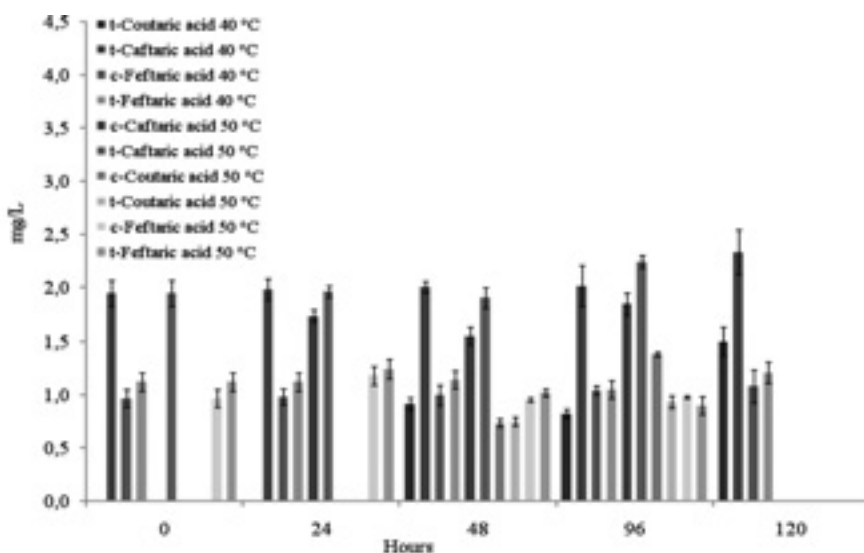


Figure 3 - Changes in esters of hidroxicinamics acids during grape-drying at 40 and 50 °C

A Figura 4 mostra as alterações nos derivados de flavan-3-ol durante o processo de secagem a 40 e 50 °C. Como se pode ver pela concentração da (+)-catequina aumentou a 40°C, ao passo que a 50 °C diminuiu. Relativamente à (-)-epicatequina foram observados aumentos em ambas as temperaturas com comportamento similar, mas sempre com valores superiores a 40 °C.

Os aumentos foram observados em menores proporções nestes compostos do que nos açucares correspondentes, devido à desidratação das uvas, o que sugere o seu envolvimento em algumas reacções que conduzem a uma redução das concentrações.

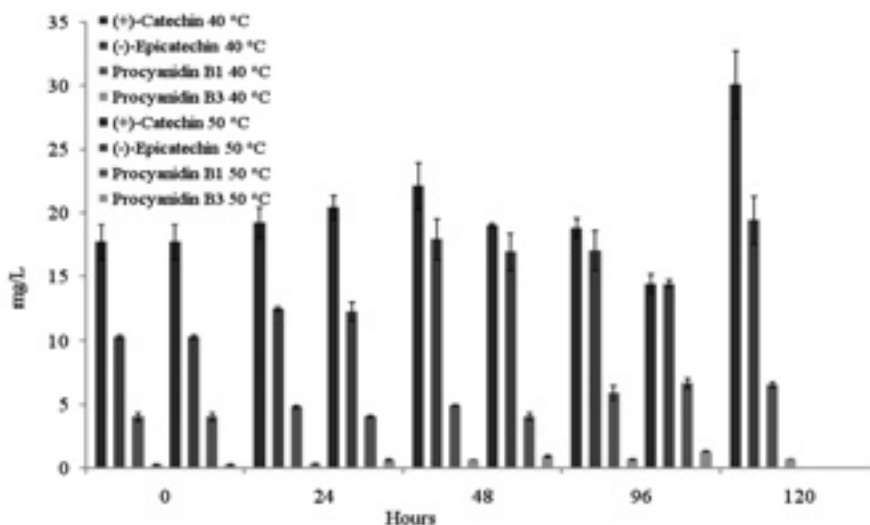


Figure 4 - Changes in flavan-3-ol during grape-drying at 40 and 50 °C

Em relação às procianidinas, a B1 foi encontrada em ambas as temperaturas numa concentração superior à de B3. A concentração de procianidina B1 aumentou a 40 °C durante o processo de secagem, atingindo um valor de 6.56 mg/L. Este valor foi inferior ao esperado devido ao efeito da concentração. A 50 °C a concentração final foi ligeiramente maior do que a 40 °C, 6.67 mg/L.

A concentração de procianidina B3 em ambas as temperaturas mostrou um aumento gradual durante o período de tempo em que foi estudada, sempre com concentrações superiores a 50 °C. A concentração inicial foi de 0.284 mg/L, atingindo no final do processo valores de 0.698 e 1.3 mg/L (2.46 e 4.58 tempos), para 40 e 50 °C respectivamente. Isto pode indicar que a 50 °C as reacções foram favorecidas, possivelmente hidrólises e oligómeros, o que resultou num aumento da concentração desse composto na temperatura mais elevada. Assim, a 40 °C este aumento foi inferior ao dos açúcares reductores.

A figura 5 mostra as alterações dos flavonóis durante o processo de secagem nas duas temperaturas estudadas. Os derivados glicosilados foram encontrados em concentrações elevadas ao longo do processo. Quercetina-3-galactosida foi encontrada em concentrações inferiores em ambos os processos, mesmo aumentando as concentrações. Em todo o caso é arriscado retirar conclusões a partir de valores pequenos. Nenhum dos restantes compostos de 40 °C registou aumentos mais elevados do que o esperado como resultado do efeito da evaporação da água a partir das uvas.

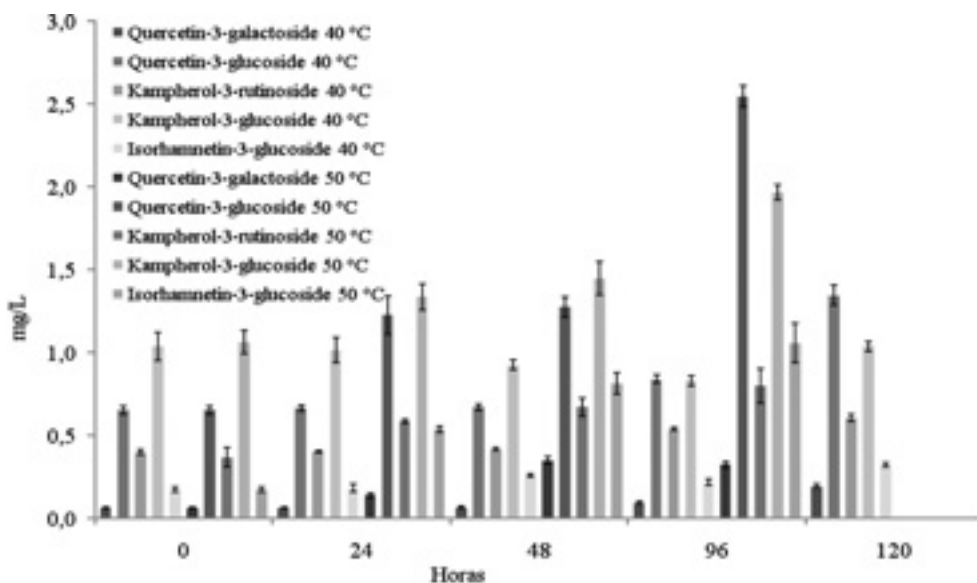


Figure 5 - Changes in flavonols during grape-drying at 40 and 50 °C

Contudo, a 50 °C os derivados glicosilados de quercetina e *isorhamnetin* registaram aumento superior ao efeito da evaporação de água, logo serão produzidas reacções para aumentar a sua concentração. Sobre isto Amiot *et al.* (1992) mostraram que os flavonóis podem estar presentes nas reacções enzimáticas que envolvam biosíntese. Amiot *et al.* (1995) salientaram que estes compostos são muito menos susceptíveis à degradação enzimática do que os ácidos hidroxicinâmicos e derivados flavan-3-ol.

Em suma, foi observado um aumento das concentrações dos diferentes compostos fenólicos durante o processo de secagem das uvas. Do ponto de vista fisiológico estes aumentos são benéficos, como resultado das suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Monagas *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAFIA

- Amiot, M.J.; Tacchini, M.; Aubert, S.Y. and Nicolas, J. **1992**. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57: 958-962.
- Amiot, M.J.; Tacchini, M.; Aubert, S.Y. and Oleszek, W. **1995**. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1132-1137.
- Dallas, C.; Hipolito-Reis, P.; Ricardo-da-Silva, J.M. and Laureano, O. **2003**. Influence of acetaldehyde, pH, and temperature on transformation of procyanidins in model wine solutions. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54: 119-124.
- Dallas, C.; Ricardo-da-Silva, J.M. and Laureano, O. **1995**. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis*, 34: 51-56.
- Haslam, E. **1980**. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19: 2577-2582.
- Jaworski, A. and Lee, C.Y. **1987**. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 35: 257-259.
- Lopez-Toledano, A.; Merida, J. and Medina, M. **2007**. Colour correction in white wines by use of immobilized yeasts. *Eur. Food Res. Technol.*, 225: 879-885.
- Macheix, J.J.; Sapis, J.C. and Fleuriet, A. **1991**. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 441-486.

- Monagas, M; Bartolome, B. and Gomez-Cordoves, C. **2005**. Update knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 45: 85-118.
- Oszmianski, J.; Ramos, T. and Bourzeix, M. **1988**. Fractionation of phenolics compounds in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39: 259-262.
- Pangavhane, D.R.; Sawhney, R.L. and Sarsavadia, P.N. **2002**. Design, development and performance testing of a new natural convection solar dryer. *Energy*, 27: 579-590.
- Singleton, V.L. **1988**. Wine phenols. In *Wine analysis*; Linskens, H. F., Jackson, J. F., Eds.; Springer-verlag: Berlin, Germany; 173-218 pp.
- Timberlake, C.F. and Bridle, P. **1976**. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27: 97-105.

ENVELHECIMENTO ACELERADO DOS VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ

María de las Nieves LÓPEZ DE LERMA; Jose PEINADO;
Juan J. MORENO³; Rafael A. PEINADO⁴

RESUMO

Os vinhos doces Pedro Ximénez sob um envelhecimento biológico acelerado foram estudados em termos de actividade antioxidante dos compostos voláteis Maillard. O vinho foi envelhecido por tratamento térmico durante 10, 20 e 30 dias na presença e ausência de aparas de carvalho. As fracções fenólicas revelaram que a actividade antioxidante depois de 10 dias de tratamento térmico se deveu à presença de fenóis e compostos polares, possivelmente compostos de reacção *Maillard*. Contudo, depois de 30 dias, a actividade antioxidante teve origem também nas procianidinas de elevado peso molecular. Os compostos voláteis *Maillard* aumentaram ao longo do tratamento térmico. A presença de aparas de carvalho teve um efeito substancial durante o tratamento com os compostos voláteis *Maillard*. O vinho obtido depois de 10 dias de tratamento térmico foi classificado como o melhor em termos de propriedades sensoriais que apresentam o equilíbrio adequado entre os aromas varietais e os que se devem aos compostos *Maillard*.

Palavras-chave: envelhecimento acelerado, actividade antioxidante, fracções fenólicas, vinho doce.

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes sugerem que alguns alimentos contêm compostos fenólicos capazes de prevenir o envelhecimento, doenças tais como a arteriosclerose e a diabetes e inflamações (GHANTA *et al.* 2007). Isto é um resultado das propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos em geral e dos flavonóides em particular. Os flavonóides presentes nos alimentos dietéticos são em grande parte flavonóis (catequinas, maioritariamente).

As uvas, especialmente as tintas, contêm, particularmente na película, grandes quantidades de compostos fenólicos que são extraídos em parte durante o processo de vinificação (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2000). A secagem das uvas brancas Pedro Ximénez, que é um processo típico na D.O. Montilla-Moriles, causa uma série de alterações que criam uma actividade antioxidante no mosto (MORENO *et al.* 2007) ao mesmo nível dos vinhos tintos (VILLANO *et al.* 2004). É também o caso do acastanhamento, que é o resultado da formação de pigmentos castanhos como efeito da reacção *Maillard* à presença de grandes quantidades de açúcar, às temperaturas elevadas atingidas pelos cachos durante a secagem ou à polimerização dos compostos fenólicos (MORENO *et al.*, 2007).

O processo de secagem implica vindimar quando a concentração de açúcar das uvas é de aproximadamente 13-14 °*Baumé*. Os cachos são transferidos para *paseras*, que são grandes áreas arenosas em colinas viradas para sul; lá, as uvas são colocadas numa malha de rede plástica ou em tapetes de esparto alinhados em filas. O tempo de secagem das uvas alcança geralmente 7 a 10 dias, dependendo das condições climáticas desse ano em particular (FRANCO *et al.* 2004). O mosto obtido depois da prensagem contém cerca de 450 g/L de açúcares, é fortificado em aproximadamente 8% (v/v) de álcool e utilizado para obter vinho Pedro Ximénez através do sistema tradicional “*criaderas y solera*” (BERLANGA *et al.* 2004). Depois de envelhecer durante um tempo predeterminado, o vinho é retirado e fortificado até 15% (v/v) de etanol antes do engarrafamento.

A configuração e manutenção do sistema “*criaderas y solera*” são muito dispendiosas (BERLANGA *et al.*, 2004). Neste sentido, a aceleração do processo seria desejável, da mesma forma que outros métodos de aceleração propostos para os vinhos “fino” (MUÑOZ *et al.* 2007) exceptuando o facto de os vinhos serem eventualmente colocados em barricas para finalizarem o envelhecimento e adquirirem em pleno as suas propriedades sensoriais previstas.

Neste trabalho, estudámos o efeito dos fenóis e dos compostos *Maillard* de um tratamento térmico para acelerar o envelhecimento oxidativo nos vinhos doces; foi estudado o seu efeito na presença e ausência de aparas de madeira de carvalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

A amostra inicial foi um vinho não envelhecido Pedro Ximénez, da colheita de 2008 das Bodegas Moreno, S.A. (Córdoba, Espanha). A amostra foi dividida em 30 sub-amostras que foram armazenadas em frascos de vidro de 100mL vedados com rolha. Todos os frascos foram levados ao forno a 65°C e retirados para amostragem depois de 10, 20 e 30 dias.

2.2. Extração de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram isolados pela passagem através de uma coluna Sep-Pack tC-18 como descreveu PEINADO *et al.* (2009). Neste sentido, foram obtidas três fracções; F1 contém ácidos fenólicos e compostos polares; F2 contém catequinas e procianidinas de baixo peso molecular; F3 contém procianidinas de elevado peso molecular.

2.3. Actividade Antioxidante

A actividade antioxidante foi medida a partir da quantidade de cromóforo azul esverdeado ABTS^{•+} formado pela oxidação de 7 mM ABTS com 2.45 mM de persulfato de potássio (RE *et al.* 1999).

2.4. Determinação dos compostos aromáticos voláteis

Os compostos voláteis foram determinados numa coluna capilar, utilizando GC-MS depois de uma extração contínua de 50 mL de vinho com 100 mL de fréon-11 durante 24h. O detector de massa foi utilizado a 1850 V em modo *scan* e o intervalo de massas estudado forneceu valores entre os 39 e os 300 amu. Os compostos aromáticos voláteis foram identificados através da comparação com as bibliotecas espectrais fornecidas por Wiley. Sempre que possível, foi feita a identificação adicional de compostos através da utilização de substâncias químicas puras fornecidas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.5. Processamento estatístico

O efeito do tratamento térmico na actividade antioxidante e nos compostos voláteis Maillard foi examinado através de um grupo de análise. Foram detectadas diferenças significativas introduzidas pela utilização de aparas de madeira através de uma análise unidireccional de variância, utilizando o software Statgraphics Plus v. 2 de STS, Inc. (Rockville, MD). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

2.6. Análise sensorial

Foi pedido a cinco provadores especializados, da adega colaboradora, para avaliarem o aroma dos vinhos seguindo o tratamento térmico na presença e ausência de aparas de carvalho, em conformidade com os seus padrões internos de qualidade para os vinhos doces Pedro Ximénez comercializados. Todas as amostras foram testadas numa sessão. Os descritores de aroma específicos utilizados foram passas, mel, herbáceo, tostado, caramelo e torrado. Os provadores deram uma classificação de 1 a 10 em ordem crescente relativamente à percepção da intensidade para cada descritor de aroma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante total (AAT) na fracção fenólica 1 atingiu os seus níveis máximos depois de 10 dias de tratamento térmico, mantendo-se depois até ao dia 30 (Tabela 1). Visto que os ácidos fenólicos não podem polimerizar ou aumentar em concentração (ZAMORA, 2003), o aumento da AAT pode ser atribuído à formação de compostos polares (provavelmente, produtos Maillard) (MORENO *et al.*, 2007). As fracções 2 e 3, que incluíram procianidinas de baixo peso molecular (BPM), catequinas e procianidinas de elevado peso molecular (EPM), apresentaram um aumento da AAT durante o tratamento devido ao efeito do calor aplicado que facilita a polimerização dos compostos fenólicos. Assim, a AAT nos vinhos aumentou à medida que o tratamento térmico progrediu; não houve, contudo, nenhuma diferença na AAT entre os dias 20 e 30 do tratamento.

Tabela 1. Actividade antioxidante (AAT) determinada pelo tratamento térmico dos vinhos (M) e das fracções fenólicas isoladas (F1, F2, F3). Letras diferentes indicam diferenças significativas a um nível de confiança de 95% devido ao tratamento térmico.

| AAT | M | F1 | F2 | F3 |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 Dias | 7.2±0.4 A | 3.4±0.2 A | 0.8±0.1 A | 1.5±0.1 A |
| 10 Dias | 13±1 B | 7.2±0.4 B | 1.4±0.1 B | 3.3±0.2 B |
| 20 Dias | 16±1 C | 6.0±0.4 C | 3.2±0.2 C | 4.8±0.3 C |
| 30 Dias | 18±1 C | 5.8±0.3 C | 3.2±0.2 C | 6.0±0.3 D |

No que diz respeito à importância de cada fracção fenólica para a actividade antioxidante do vinho (Tabela 2), a AAT na amostra não tratada deveu-se, no geral, aos ácidos fenólicos, mas também, de forma substancial, às procianidinas de EPM. Depois de 10 dias, as amostras tratadas termicamente apresentaram níveis de AAT semelhantes aos das amostras não tratadas. No dia 20, contudo, o contributo dos ácidos fenólicos para a AAT tinha diminuído nas amostras tratadas; por outro lado, os das procianidinas de EPM e BPM e das catequinas tinha aumentado. Depois de 30 dias de tratamento, os ácidos fenólicos tinham contribuído de forma similar ao que já tinham feito depois de 20 dias, enquanto as procianidinas de BPM e as catequinas contribuíram menos acentuadamente do que na data anterior.

Tabela 2. Contributo de cada fracção isolada de compostos fenólicos (F1, F2, F3) para a actividade antioxidante (AAT) dos vinhos tratados termicamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%.

| % Contributo das fracções para o AAT | F1 | F2 | F3 |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 Dias | 60.804±0.002 A | 13.756±0.004 A | 25.440±0.001 A |
| 10 Dias | 59.87±0.01 B | 12.950±0.001 B | 27.179±0.001 B |
| 20 Dias | 42.975±0.001 C | 23.148±0.001 C | 34.877±0.001 C |
| 30 Dias | 38.773±0.002 D | 21.632±0.001 D | 39.595±0.001 D |

3.2. Produtos Voláteis Maillard

As figuras 1 e 2 mostram a concentração de produtos voláteis na reacção Maillard. Todos os furfurais detectados aumentaram significativamente em concentração durante o tratamento térmico. Isto foi o que aconteceu nomeadamente no caso do 5-hidroximetilfur-

fural, que se forma com a conversão de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) ou a sua condensação com o etanol (CUTZACH *et al.* 1999).

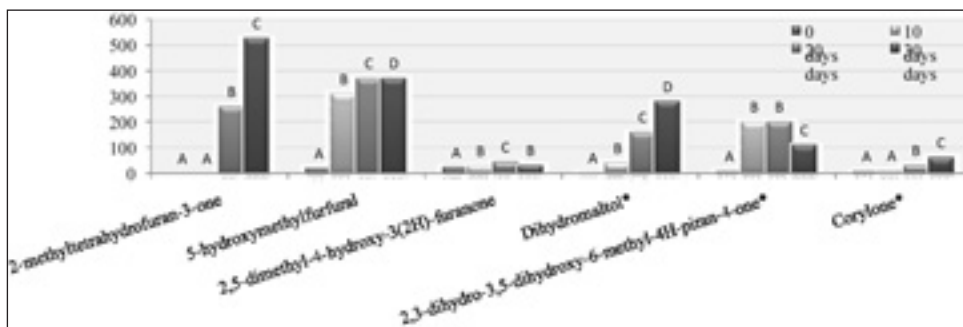


Figura 1. Concentração (µg/L) de compostos voláteis Maillard (* expressos no padrão interno µg/L)

A concentração de dihidromaltol aumentou também significativamente durante o tratamento térmico. Por outro lado, a concentração de 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP), que recentemente provou ter um efeito anticarcinogénico contra o cancro do cólon (BAN *et al.* 2007), aumentou significativamente nos primeiros 10 dias e depois diminuiu ligeiramente no final do tratamento.

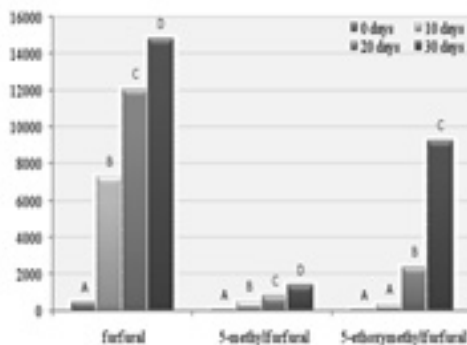


Figura 2. Concentração (µg/L) de compostos voláteis Maillard

As concentrações de 2-metiltetrahydrofuran-3-one, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona e dihidro-2-metil-3(2h)-furanona aumentaram durante o tratamento térmico.

O Corylon, que pode ser formado a partir de 2-hidroxiopropanal (um produto da clivagem de D-frutose) (BALTES, 1988) ou DDMP (KIM e BALTES, 1996), também aumentou significativamente em concentração durante o tratamento.

3.3. Análise Sensorial informal

O objectivo do teste de análise sensorial informal foi avaliar se o tratamento térmico melhorou as características organolépticas do vinho não envelhecido (que também não foi tratado).

A figura 3 mostra a intensidade do aroma no vinho inicial, os vinhos tratados termicamente em comparação com os das amostras não tratadas. Como se pode observar, as notas varietais (uva passa, caramelo e vegetal) desapareceram gradualmente em todos os vinhos. Simultaneamente, os vinhos tratados desenvolveram gradualmente notas a tostado, café e madeira queimada, típicas dos produtos de reacção Maillard.

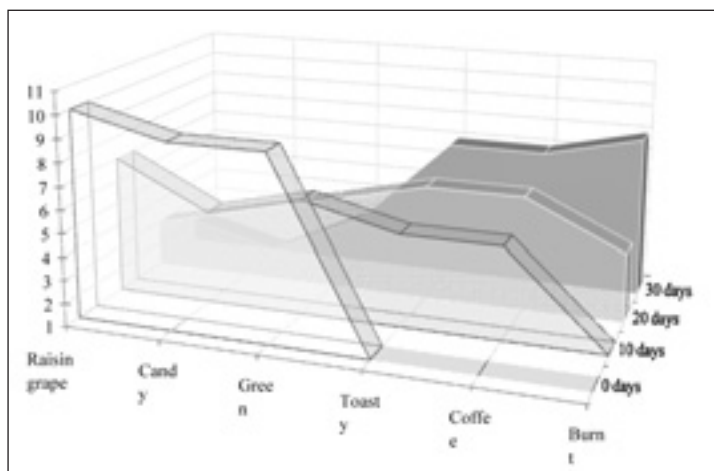


Figura 3. Intensidade de aroma determinado nos vinhos doces Pedro Ximénez sob tratamento térmico.

Por último, os provadores deram pontuações altas aos vinhos tratados durante 10 dias na presença e ausência de aparas, nomeadamente no que concerne ao equilíbrio entre os aromas primários e terciários. Todos os outros vinhos foram classificados com pontuações demasiado altas nas notas a tostado e queimado, desviando-se do aroma típico dos vinhos doces Pedro Ximénez. Por outro lado, os vinhos tratados termicamente durante 20 e 30 dias e com aparas de carvalho foram rejeitados devido ao excesso de notas a carvalho.

4. CONCLUSÃO

A utilização de tratamento térmico para acelerar o envelhecimento oxidativo nos vinhos doces Pedro Ximénez demonstrou aumentar a actividade antioxidante através de um aumento nas concentrações de ácidos fenólicos, compostos polares e procianidinas de EPM, sendo atingido o maior pico depois de 10 dias de tratamento. O tratamento térmico aumentou as concentrações de produtos voláteis Maillard, que se reflectiram na presença de descritores de aroma típicos para os vinhos envelhecidos oxidativamente. Um painel de provadores declarou que os vinhos obtidos depois de 10 dias de tratamento térmico possuem um equilíbrio óptimo entre as notas varietais e as notas que se devem aos produtos voláteis Maillard. Este é o perfil sensorial típico para os vinhos doces Pedro Ximénez e são consistentes com o facto de que a actividade antioxidante também atingiu o seu pico após 10 dias de tratamento térmico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da concessão do Ministério da Ciência e Inovação do Governo Espanhol (INIA project RTA 2008-00056-CO2) e da bolsa de estudo FPU do Ministério da Educação (anúncio oficial 2008). Os autores estão também gratos pela colaboração da adega (Moreno, S.A., Córdoba, Espanha).

BIBLIOGRAFIA

- Baltes, W. (1988). Investigation on thermal aroma formation. Proceedings of the 5th International Flavor Conference, Porto Karras, Chalkidiki, Greece, July 1-3, 1987; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands (pp 575-584).
- Ban, J.; Hwang, I., Kim, T.; Hwang, B.; Lee, U.; Jeong, H.; Yoon, Y.; Kim, D.; and Hong, J. (2007). Anti-proliferate and Pro-apoptotic Effects of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through Inactivation of NF-KB in Human Colon Cancer Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 30, 1455-1463.
- Berlanga, T.M.; Peinado, R.A.; Millan, C.; Mauricio, J.C.; and Ortega, J.M. (2004). Influence of blending on the content of different compounds in the biological aging of sherry dry wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2577-2581.
- Cutzach, L.; Chatonnet, P.; and Duburdiou, D. (1999). Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the aging of "sweet" fortified wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2837-2846.
- Franco, M.; Peinado, R.A.; Medina, M.; and Moreno, J. (2004). Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3905-3910.
- Ghanta, S.; Banerjee, A.; Poddar, A.; and Chattopadhyay, S. (2007). Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10962-10967.
- Kim, M.O.; and Baltes, W. (1996). On the Role of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 282-289.
- Moreno, J.; Peinado, J.; and Peinado, R. A. (2007). Antioxidant activity of musts from Pedro Ximénez grapes subjected to off-vine drying process. *Food Chemistry*, 107, 224-228.
- Muñoz, D.; Peinado, R.A.; Medina, M.; and Moreno, J. (2007). Biological aging of sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces cerevisiae* Var. capensis: effect on odorant series. *Food Chemistry*, 100, 1188-1195.
- Peinado, J.; López de Lerma, N.; Moreno, J.; and Peinado, R.A. (2009). Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximenez grapes at different stages of the off-vine drying process. *Food Chemistry* 114, 1050-1055.
- Re, R.; Pellegrini, A.; Pannala, A.; Yang, M.; and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ribèreau-Gayon, P.; Dubourdiue, D.; Donèche, B.; and Lonvaud, A. *Handbook of enology* (Vol. I). New York: Wiley. (2000).
- Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; and García-Parrilla, M. C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: Influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64, 501-509.
- Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV ediciones. 2003.



COMPORTAMENTO AGRONÓMICO E ENOLÓGICO DAS CASTAS SYRAH E TOURIGA NACIONAL EM SEIS “TERROIRS” DE PORTUGAL

Paula FERNANDES⁽¹⁾; Amândio CRUZ⁽¹⁾; Catarina VIEIRA⁽²⁾;
Joana de CASTRO⁽³⁾; Diogo LOPES⁽⁴⁾; Carlos LUCAS⁽⁵⁾; Fernando
RIBEIRO⁽¹⁾; Jorge RICARDO-DA-SILVA⁽¹⁾; Rogério de CASTRO⁽¹⁾

RESUMO

O estudo teve como objectivo a comparação do comportamento agronómico e enológico de duas castas, a Touriga Nacional e a Syrah, em várias regiões (6 locais) de Portugal: Vinhos Verdes (Lousada), Dão (Carregal do Sal), Lisboa (Leiria e Lisboa) e Alentejo (Cabeção e Vidigueira), durante o ciclo vegetativo de 2008. Ao longo do ciclo foi acompanhada a fenologia e, após o pintor, foram colhidas amostras semanais de bagos para a caracterização da cinética da maturação, sendo prevista a vindima quando o teor alcoólico provável (TAP) atingisse os 13 /13,5°. Nos parâmetros do rendimento verificaram-se valores distintos em ambas as castas e nos diferentes *terroirs*, tal como nos parâmetros da qualidade de bagos e mostos. A análise sensorial revelou também, diferenças significativas nos vinhos das várias parcelas, diferenças corroboradas pelos valores obtidos nalguns parâmetros da composição fenólica. Os resultados revelaram interacções entre locais e castas, evidenciando assim a sua maior ou menor adequação às diferentes regiões.

Palavras-chave: Touriga Nacional, Syrah, regiões vitivinícolas, rendimento, análise físico-química e análise sensorial.

¹ INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, (rcastro@isa.utl.pt)

² HERDADE DO ROCIM, (catarina.vieira@movicortes.pt)

³ QUINTA DE LOUROSOSA – SOC. AGRÍCOLA, LDA. (info@quintadelourosa.com)

⁴ SOC. AGRÍCOLA DO VALE DE JOANA, LDA (diogo.lopes@grou.pt)

⁵ DÃO SUL – SOCIEDADE VITIVINÍCOLA, S.A. (carloslucas@daosul.com)

1. INTRODUÇÃO

A ‘Touriga Nacional’ é unanimemente considerada uma das mais nobres castas portuguesas e também uma das mais antigas das regiões do Dão e Douro, das quais será originária. É uma casta que se comporta de maneira distinta e por vezes muito irregular, em função dos solos e condições climáticas onde é cultivada (Magalhães, 1989). Hoje em dia, esta casta é usada praticamente em todas as regiões portuguesas, estando também em franca internacionalização (Castro *et al.*, 2007b).

Por sua vez a casta Syrah é uma casta com fama internacional, com adaptabilidade a muitas regiões vitivinícolas a nível mundial, sendo uma das principais castas utilizadas pelos países da “nova viticultura”.

Pretende-se com o presente trabalho obter um melhor conhecimento da influência de alguns dos factores determinantes na quantidade e na qualidade da produção vitícola, para as duas castas, Touriga Nacional e Syrah nas seis parcelas em estudo: Vinhos Verdes (Lousada), Dão (Carregal do Sal), Lisboa (Leiria e Lisboa) e Alentejo (Cabeção e Vidigueira).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho decorreu simultaneamente em seis locais do país durante o ano de 2008: Lousada - Vinhos Verdes (LOU); Carregal do Sal - Dão (DAO); Leiria e Lisboa -Estremadura (LEI e LIS); Cabeção e Vidigueira - Alentejo (CAB e VID).

2.1. Vinhas/parcelas

Quadro 1 Características gerais das parcelas em estudo (coordenadas: latitude-lat., longitude-long.; ano de plantação; porta-enxerto; sistema de condução)

| parcela | coordenadas | | ano de plantação | porta enxerto | sistema de condução | | |
|---------|-------------|--------|------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| | Lat. | Long. | | | Compasso (m) | orientação das linhas | forma de condução |
| LOU | 41°17'N | 8°18'W | 1996 | 110R | 3,5x1,25 | E-O | Lys 2/3 |
| DAO | 40°25'N | 7°59'W | 2003 (T.N) | 110R (T.N) | 2,5x1 (T.N) | N-S | Lys (T.N) |
| | | | 2004 (Syrah) | 1103P(Syrah) | 2,5x1,2 (Syrah) | | M.V.A (Syrah) |
| LEI | 39°41'N | 8°46'W | 2005 | 110R (T.N) 140Ra(Syrah) | 2,5x1 | NE-SO | M.V.A |
| LIS | 38°42'N | 9°11'W | 1998 | 140Ra | 2,4x1,2 | N-S | M.V.A |
| CAB | 38°56'N | 8°04'W | 2003 | 110R (T.N) 140Ra(Syrah) | 2,8x1 | N-S | Lys |
| VID | 38°11'N | 7°51'W | 2004 (T.N) | 110R (T.N) | 2,8x1 | E-O | Lys (T.N) |
| | | | 2001 (Syrah) | 99R (Syrah) | | | M.V.A (Syrah) |

2.2. Delineamento Experimental

A evolução da fenologia ao longo do ciclo vegetativo foi feita com base na escala de Baggioini, registando-se a data do abrolhamento (B), a floração (I) e o pintor (M). A maturação foi acompanhada através de amostragens semanais de 300 bagos colhidos aleatoriamente ao longo das parcelas. As análises foram realizadas no laboratório Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronomia (ISA), tendo sido analisados os seguintes parâmetros: peso e volume dos bagos, volume do sumo, °BRIX, acidez total e pH. Foi previamente definido que a vindima seria realizada quando o TAP dos bagos atingisse sensivelmente os 13,5° (% v/v), nessa data, foram também analisadas as antocianinas totais, índice de fenóis totais e intensidade/tonalidade da cor dos bagos e, foi registado o número de cachos e peso por cepa, numa amostra aleatória de 30 videiras. As uvas de todas as parcelas foram microvinificadas na adega do ISA, utilizando 50 quilos de uva, às quais apenas se adicionou 50mg/Kg de sulfuroso e o tempo de maceração foi de 15 dias à temperatura ambiente. As análises aos bagos, mostos e vinhos, realizaram-se segundo os métodos de seguida apresentados: teor alcoólico; acidez total e volátil; pH; SO₂ livre, combinado e total; massa volúmica; açúcares redutores e extracto seco, foram determinados segundo os métodos oficiais (OIV, 2010). As antocianinas totais e coradas, compostos fenólicos totais e flavonóides, assim como a intensidade e tonalidade da cor, foram determinados segundo Somers e Evans (1974,1977). Os pigmentos totais e poliméricos segundo Somers (1971). A cor devido à copigmentação foi determinada segundo o método proposto por Boulton (2001) e por fim, o poder tanante foi determinado segundo o método de Freitas e Mateus (2001). A prova organoléptica realizou-se no mês de Maio de 2009. A análise estatística dos dados recolhidos foi realizada com um universo de 12 provadores (repetições), os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância, usando o teste *Fisher LSD* e expressos como, significativos para $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização climática: Sistema de Classificação Climática Multicri-tério (CCM) Geovítica

O Sistema CCM Geovítica, definido por Tonietto e Carboneau (2004), tem como base o cálculo de 3 índices, o Índice Heliotérmico (calculado segundo Huglin, 1978), o Índice de frescura das noites (IF) e o Índice de seca (IS) (Quadro 2).

Ao observar os dados do índice heliotérmico (IH), verifica-se que no ano de 2008, é a parcela DAO a que apresenta menor valor (entre 1500 e 1800), sendo classificada como tendo um clima vitícola frio. As parcelas LOU e LEI encontram-se no intervalo seguinte (entre 1800 e 2100), sendo classificadas como de clima temperado. Com IH entre 2100 e 2400, encontra-se a parcela LIS, classificada como temperada quente, e por fim, um IH entre 2400 e 3000, é obtido nas parcelas CAB e VID, consideradas de clima quente.

Quadro 2- Índice Hélotérmico (IH), Índice de frescura das noites (IF), Índice de Secura (IS) e suas respectivas classes, segundo Tonietto e Carboneau (2004), para as diferentes parcelas em estudo.

| Parcela | IH | IF (°C) | IS (mm) | Classe | | |
|---------|------|---------|---------|--------|------|------|
| | | | | IH | IF | IS |
| LOU | 1859 | 12,9 | 13 | IH-1 | IF+1 | IS+1 |
| DAO | 1724 | 12,3 | -71 | IH-2 | IF+1 | IS+1 |
| LEI | 1909 | 13,7 | -87 | IH-1 | IF+1 | IS+1 |
| LIS | 2328 | 17,6 | -152 | IH+1 | IF-1 | IS+2 |
| CAB | 2489 | 11,2 | -194 | IH+2 | IF+2 | IS+2 |
| VID | 2606 | 14,6 | -141 | IH+2 | IF-1 | IS+2 |

Relativamente ao IF, a parcela CAB, é a única classificada com tendo noites muito frescas. A classificação de noites frescas, foi obtida nas parcelas LOU, DAO e LEI e por fim, as parcelas LIS e VID são avaliadas como tendo noites temperadas. No que respeita ao IS, as parcelas LOU, DAO e LEI, são classificadas como moderadas, enquanto as parcelas mais a Sul (LIS, CAB e VID), são consideradas como secas.

3.2. Resultados agronómicos e enológicos

3.2.1. Parâmetros do rendimento

Através da análise do Quadro 3 verifica-se que na casta Touriga Nacional, LOU foi a parcela onde se registou o maior número de cachos por cepa, que consequentemente conduziu a cachos mais leves. O número de cachos foi inferior nas parcelas LEI e VID,

porque aqui foi efectuada monda de cachos. Os cachos mais pesados obtiveram-se em LEI e VID, devido ao seu baixo número e, no caso de CAB e VID, à existência de rega. O rendimento mais elevado obteve-se em CAB devido ao grande número de cachos e ao seu elevado peso. Em relação à casta Syrah, foi novamente a parcela CAB a que obteve maior rendimento, o que consequentemente deu origem a uma elevada produção por cepa. A parcela LOU, obtém um rendimento médio, com uma elevada produção por cepa, devido a um elevado número de cachos, mas de baixo peso. Na parcela DAO, os dados para estes parâmetros foram médios em comparação com as outras parcelas. A parcela LEI, é que obtém o valor de rendimento e número de cachos mais baixo, devido à monda de cachos realizada, no entanto, como consequência obtém o dobro do peso do cacho em relação às restantes parcelas. Na parcela LIS obteve-se um valor médio do número de cachos, no entanto o valor do peso destes é baixo, dando origem a uma baixa produção, possivelmente devido a algum *stress* hídrico. Por fim, a parcela VID tem registar um valor de produção por cepa médio, sendo o valor do número de cachos relativamente baixo, devido à monda de cachos efectuada, o que terá contribuído para o rendimento médio obtido na parcela.

Quadro 3 Parâmetros do rendimento das castas **Touriga Nacional** e **Syrah** para as 6 parcelas em estudo. Média \pm epm (n=30)

| Touriga Nacional | | | | |
|------------------|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Parcela | Nºcachos /cepa | Produção/cepa (kg) | Peso/cacho (g) | Rendimento (t/ha) |
| LOU | 43 \pm 3,23 | 2,3 \pm 0,21 | 54,3 \pm 2,97 | 5,4 \pm 0,47 |
| DAO | 22 \pm 0,81 | 1,7 \pm 0,07 | 82,0 \pm 4,07 | 6,9 \pm 0,28 |
| LEI | 12 \pm 0,49 | 2,0 \pm 0,09 | 176,6 \pm 5,80 | 8,1 \pm 0,37 |
| LIS | 29 \pm 0,87 | 2,8 \pm 0,17 | 97,8 \pm 6,44 | 9,3 \pm 0,56 |
| CAB | 28 \pm 1,09 | 4,5 \pm 0,27 | 163,6 \pm 8,01 | 16,1 \pm 0,96 |
| VID | 12 \pm 0,35 | 1,8 \pm 0,09 | 153,2 \pm 5,64 | 6,4 \pm 0,32 |
| Syrah | | | | |
| LOU | 35 \pm 2,03 | 4,5 \pm 0,26 | 126,2 \pm 3,33 | 10,2 \pm 0,58 |
| DAO | 18 \pm 0,89 | 2,7 \pm 0,17 | 157,1 \pm 8,32 | 10,8 \pm 0,66 |
| LEI | 7 \pm 0,30 | 2,0 \pm 0,10 | 281,2 \pm 11,97 | 7,8 \pm 0,41 |
| LIS | 23 \pm 1,80 | 2,4 \pm 0,25 | 102,6 \pm 5,77 | 8,0 \pm 0,83 |
| CAB | 25 \pm 0,97 | 3,6 \pm 0,19 | 145,1 \pm 6,60 | 13,0 \pm 0,68 |
| VID | 19 \pm 0,85 | 2,9 \pm 0,16 | 155,1 \pm 8,22 | 10,3 \pm 0,58 |

3.2.2. Características dos bagos à vindima

Da análise do Quadro 4, verificamos que a parcela LOU, possui o maior valor de peso do bago, assim como o pH mais baixo, que também corresponde a uma acidez mais elevada. As parcelas DAO e LOU são as que registam maiores valores em compostos fenólicos (índice de fenóis totais (IFT) e teor em antocianinas totais e consequentemente uma maior intensidade da cor. Por outro lado, as parcelas localizadas mais a Sul do país (CAB e VID) são as que possuem menores valores do peso do bago, menor acidez total, assim como, menores teores de antocianinas totais e IFT, observando-se também, uma menor intensidade da cor.

Quadro 4 Dados para a casta **Touriga Nacional**, do peso por bago, Teor Alcoólico Provável (T.A.P), pH, acidez total, teor em antocianinas totais, índice de fenóis totais (IFT) e a tonalidade/intensidade da cor (ua: unidades de absorvência), à data da vindima

| Parcela | Peso bago (g) | T.A.P (% v/v) | pH | Ac.Total (g ac.tartárico/L) | Antoc.Totais (mg/L) | I.F.T (ua) | Intensidade da cor (ua) |
|---------|---------------|---------------|------|-----------------------------|---------------------|------------|-------------------------|
| LOU | 1,89 | 11,7 | 3,31 | 7,28 | 1827,7 | 80,5 | 24,03 |
| DAO | 1,76 | 12,0 | 3,38 | 5,90 | 2489,2 | 104,4 | 30,31 |
| LEI | 1,68 | 13,1 | 3,45 | 5,70 | 1510,8 | 67,9 | 21,32 |
| LIS | 1,30 | 13,1 | 3,40 | 4,70 | 1787,7 | 76,3 | 23,02 |
| CAB | 1,36 | 12,2 | 3,85 | 3,90 | 990,8 | 60,3 | 13,66 |
| VID | 1,24 | 13,5 | 3,57 | 4,05 | 1335,4 | 57,6 | 15,85 |

Quadro 5. Dados para a casta **Syrah**, do peso por bago, Teor Alcoólico Provável (T.A.P), pH, acidez total, teor em antocianinas totais, índice de fenóis totais (IFT) e a tonalidade/intensidade da cor (ua: unidades de absorvência), à data da vindima.

| Parcela | Peso bago (g) | T.A.P (% v/v) | pH | Ac.Total (g ac.tartárico/L) | Antoc.Totais (mg/L) | I.F.T (ua) | Intensidade da cor (ua) |
|---------|---------------|---------------|------|-----------------------------|---------------------|------------|-------------------------|
| LOU | 1,89 | 11,1 | 3,33 | 8,40 | 541,5 | 43,9 | 10,1 |
| DAO | 1,70 | 13,0 | 3,45 | 5,70 | 1976,9 | 80,9 | 26,05 |
| LEI | 1,79 | 13,6 | 3,51 | 6,10 | 1170,8 | 46,9 | 15,26 |
| LIS | 1,48 | 14,0 | 3,54 | 4,70 | 1909,2 | 66,7 | 19,51 |
| CAB | 1,33 | 13,0 | 3,58 | 5,70 | 1156,6 | 51,3 | 13,56 |
| VID | 1,31 | 14,0 | 3,28 | 5,70 | 1770,8 | 68,2 | 22,10 |

Na casta Syrah (Quadro5), verifica-se que é na parcela VID que o pH é mais baixo, apesar de não ser a parcela com a maior acidez total. Quanto aos parâmetros da cor e do Índice de Fenóis Totais (I.F.T), verifica-se que os valores mais baixos correspondem à parcela LOU, sendo que os maiores valores são registados nas parcelas DAO, LIS e VID, não se verificando nenhuma correspondência com as diferenças climáticas que aí foram verificadas. O que pode evidenciar uma maior adaptabilidade desta casta a vários *terroirs*.

3.2.3. Características físico-químicas dos vinhos

O teor de antocianinas coradas, está directamente relacionado com o pH do vinho e em razão inversa. Como se pode observar a partir do Quadro 6 essa relação verifica-se, sendo nos vinhos das parcelas LOU e LIS, os locais com menor pH e maior teor de antocianinas coradas, que consequentemente origina maiores valores de ionização. Em relação aos pigmentos poliméricos, observam-se os maiores valores nas parcelas VID, LOU e LIS. Verifica-se, também, que as parcelas com maior intensidade da cor se situam nos extremos opostos do país (LOU e VID), sendo a parcela CAB a registar o menor valor. No que respeita aos valores da copigmentação, estes não possuem diferenças significativas de parcela para parcela. Em relação ao IFT e ao teor em compostos não flavonóides, observa-se que os maiores valores são registados na parcela DAO, sendo os menores na parcela CAB. No que respeita ao poder tanante, em todas as parcelas se obtém valores considerados elevados, mas é na parcela LOU, local mais a Norte, que se verifica o maior valor, enquanto o menor foi registado na parcela DAO, o que provavelmente indicará uma maior “macieza” deste vinho.

Ao comparar os valores de TAP obtidos nos bagos desta casta nas parcelas LOU e DAO, com o teor alcoólico obtidos nos vinhos, verificam-se grandes diferenças que poderão estar relacionadas com uma pequena incidência de *Botrytis cinerea*, que terá provocado desidratação dos bagos e a consequente concentração de açúcares e compostos fenólicos (Donèche, 1992), por essa razão nestas parcelas e, para a casta em questão a vindima foi realizada antes dos 13/13,5° em TAP (% v/v), tendo em conta as previsões meteorológicas que apontavam para a ocorrência de chuvas e o consequente agravamento do estado sanitário

Quadro 6 Teor Alcoólico, Acidez total, pH e quantificação de alguns compostos fenólicos dos vinhos da casta **Touriga Nacional**, após a fermentação alcoólica e maloláctica. **ua:** unidades de absorvência.

| Parcela | T.Alcoólico (%v/v) | Acidez Total (g ácido tartárico/L) | pH | Antocianinas | | | Intensidade cor (au) | Poder Tanante (NTU/ml) |
|---------|-----------------------|---------------------------------------|------|------------------|-------------------|------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | | | Totais (mg/L) | Coradas (mg/L) | Ionização (%) | | |
| LOU | 14,5 | 8,3 | 3,47 | 432,7 | 76,20 | 17,6 | 12,8 | 582,5 |
| DAO | 15,3 | 7,1 | 3,57 | 480,3 | 40,00 | 8,3 | 10,4 | 434,0 |
| LEI | 13,5 | 6,7 | 3,69 | 467,1 | 37,20 | 8,0 | 8,4 | 507,0 |
| LIS | 14,6 | 6,4 | 3,64 | 497,9 | 51,80 | 10,4 | 10,8 | 461,9 |
| CAB | 13,6 | 5,9 | 4,06 | 347,0 | 20,80 | 6,0 | 6,4 | 487,6 |
| VID | 14,0 | 6,0 | 3,81 | 475,9 | 47,00 | 9,9 | 11,3 | 487,4 |

| Parcela | Pigmentos | | Copigmentação (%) | Compostos Fenólicos | | |
|---------|----------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|---|
| | Totais (au) | Poliméricos (au) | | Totais (mg ácido gálico/L) | Flavonóides (mg ácido gálico/L) | Não flavonóides (mg ácido gálico/L) |
| LOU | 24,64 | 3,01 | 24,2 | 2069 | 1871 | 197 |
| DAO | 26,77 | 2,75 | 23,0 | 2230 | 2043 | 187 |
| LEI | 25,55 | 2,20 | 30,6 | 1709 | 1514 | 195 |
| LIS | 27,88 | 2,98 | 26,1 | 1865 | 1623 | 241 |
| CAB | 19,29 | 1,94 | 23,1 | 1596 | 1419 | 177 |
| VID | 26,97 | 3,17 | 25,1 | 1939 | 1764 | 175 |

No caso da casta Syrah (Quadro 7), o maior valor da acidez total é novamente registado na parcela LOU, diminuindo à medida que nos deslocamos para as parcelas mais a Sul. No que respeita aos valores de antocianinas totais, são registados valores médios, mas o valor de ionização destas é um valor muito baixo o que se repercute no valor da intensidade da cor, sendo os valores mais elevados, nas parcelas LEI e LIS, seguindo-se as parcelas mais a SUL, sendo que a parcela LOU, obteve o valor mais baixo. Regra geral, ocorreu um decréscimo da copigmentação das parcelas mais a Norte para as parcelas mais a Sul, e o inverso sucedeu com a polimerização. No que respeita aos valores do poder tanante, são as parcelas no Alentejo que obtêm os valores mais expressivos.

Quadro 7. Teor Alcoólico, Acidez total, pH e quantificação de alguns compostos fenólicos dos vinhos da casta Syrah, após a fermentação alcoólica e maloláctica **ua**: unidades de absorvência

| Parcela | T.Alcoólico (%) | Acidez Total (g ácido tartárico/L) | pH | Antocianinas | | | Intensidade cor (au) | Poder Tanante (NTU/ml) |
|---------|-----------------|------------------------------------|------|---------------|----------------|---------------|----------------------|------------------------|
| | | | | Totais (mg/L) | Coradas (mg/L) | Ionização (%) | | |
| LOU | 11,2 | 8,6 | 3,45 | 316,6 | 13,20 | 4,2 | 3,7 | 278,3 |
| DAO | 13,4 | 7,0 | 3,77 | 422,7 | 36,00 | 8,5 | 6,6 | 369,0 |
| LEI | 13,4 | 6,1 | 3,64 | 495,7 | 46,20 | 9,3 | 8,2 | 279,8 |
| LIS | 14,2 | 6,1 | 3,68 | 533,9 | 44,20 | 8,3 | 8,9 | 342,8 |
| CAB | 12,7 | 5,8 | 3,83 | 402,7 | 31,80 | 7,9 | 7,1 | 424,8 |
| VID | 13,8 | 7,1 | 3,45 | 377,1 | 35,80 | 9,5 | 7,4 | 452,4 |

| Parcela | Pigmentos | | Copigmentação (%) | Compostos Fenólicos | | |
|---------|-------------|------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| | Totais (au) | Poliméricos (au) | | Totais (mg ácido gálico/L) | Flavonóides (mg ácido gálico/L) | Não flavonóides (mg ácido gálico/L) |
| LOU | 16,97 | 1,14 | 34,3 | 1169 | 1013 | 156 |
| DAO | 22,73 | 1,59 | 31,0 | 1292 | 1139 | 152 |
| LEI | 26,66 | 1,88 | 30,3 | 1476 | 1276 | 200 |
| LIS | 28,99 | 2,29 | 30,9 | 1441 | 1226 | 214 |
| CAB | 21,92 | 1,78 | 30,0 | 1373 | 1215 | 158 |
| VID | 20,91 | 2,05 | 26,1 | 1227 | 1071 | 156 |

3.2.4 Características sensoriais dos vinhos

Ao analisar o Quadro 8, verifica-se uma diferença significativa na cor violácea dos vinhos, com maiores valores em VID, LOU e LIS e, um baixo valor na CAB.

Quadro 8. Médias e análise estatística (ANOVA-teste Fisher LSD), dos vários atributos da análise sensorial para a casta **Touriga Nacional**, nas seis parcelas em estudo. Significativos para $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***).

| Parcelas | Cor | | Aroma | | | Gosto | | | Apreciação global |
|----------|----------|----------|---------|--------|-------------|--------|---------------|--------|-------------------|
| | violácea | vermelha | frutado | floral | intensidade | Corpo | adstringência | acidez | |
| LOU | 3,8 ab | 3,7 | 3,5 | 3,1 ab | 3,8 | 3,6 a | 3,8 a | 3,3 | 3,3 a |
| DAO | 2,8 c | 3,3 | 3,4 | 3,4 a | 3,6 | 3,3 ab | 3,3 ab | 2,8 | 3,3 a |
| LEI | 3,1 bc | 3,3 | 3,1 | 3,1 ab | 3,6 | 3,3 ab | 3,2 ab | 3,0 | 3,4 a |
| LIS | 3,6 abc | 3,7 | 3,6 | 3,3 a | 3,3 | 3,5 a | 2,8 b | 2,8 | 3,4 a |
| CAB | 1,8 d | 2,9 | 2,9 | 2,5 b | 3,2 | 2,8 b | 2,7 b | 2,7 | 2,7 b |
| VID | 3,9 a | 3,7 | 3,0 | 2,7 ab | 3,4 | 3,5 a | 2,8 b | 2,6 | 3,2 ab |
| Sig. | * | ns | ns | * | ns | * | * | ns | * |

Verificam-se também, diferenças significativas para a componente floral do aroma e para as componentes corpo e adstringência. Quanto à apreciação global, a análise estatística evidência diferenças entre os vinhos das várias parcelas, alcançando melhores resultados os vinhos das parcelas mais a Norte do país, sendo CAB, a parcela com menor valor.

Quadro 9. Médias e análise estatística (ANOVA-teste Fisher LSD), dos vários atributos da análise sensorial para a casta **Syrah**, nas seis parcelas em estudo. Significativos para $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***)

| Parcelas | Cor | | Aroma | | | Corpo | | | Apreciação Global |
|----------|----------|----------|---------|--------|-------------|--------|---------------|--------|-------------------|
| | violácea | vermelha | frutado | floral | intensidade | corpo | adstringência | acidez | |
| LOU | 1,3 b | 2,6 b | 2,3 b | 2,0 b | 2,8 b | 1,9 c | 2,3 b | 3,2 | 1,6 c |
| DAO | 3,3 a | 3,3 ab | 3,1 ab | 2,3 ab | 3,4 ab | 3,1 b | 3,3 a | 3,1 | 2,8 b |
| LEI | 3,6 a | 3,6 a | 3,6 a | 2,4 ab | 3,7 a | 3,3 ab | 3,2 a | 2,7 | 3,2 ab |
| LIS | 3,8 a | 3,7 a | 3,3 a | 2,8 ab | 3,3 ab | 3,7 a | 2,9 ab | 3,1 | 3,6 a |
| CAB | 3,5 a | 3,3 ab | 3,3 a | 2,9 a | 3,3 ab | 3,5 ab | 3,2 a | 3,0 | 3,4 ab |
| VID | 3,3 a | 3,3 ab | 3,2 a | 2,7 ab | 3,0 ab | 3,1 b | 2,8 ab | 3,0 | 3,0 ab |
| Sig. | *** | * | * | * | * | * | ** | m | * |

O Quadro 9, evidencia que para a casta Syrah, a parcela que obteve valores mais baixos, para todas as variáveis e, significativamente distintos das outras regiões, foi a parcela LOU. Sendo que as diferenças mais significativas, são observadas na cor violácea e no corpo. Não existe nenhum parâmetro que possa distinguir as parcelas entre si (com excepção de LOU), no entanto, na apreciação global, os vinhos mais bem classificados são os das parcelas LIS, CAB e LEI, respectivamente, dados que corroboram os valores da análise química (Quadro9).

CONCLUSÕES

O trabalho realizado, embora de um único ano, parece indicar o elevado potencial da casta Touriga Nacional e da casta Syrah em qualquer uma das parcelas em estudo.

Segundo o Sistema CCM Geovítica, estamos perante parcelas com características climáticas distintas.

Verificou-se uma grande disparidade no rendimento obtido, nomeadamente ao nível do peso médio do cacho. O peso do bago decresceu de Norte para Sul do país, mesmo com rega nas duas parcelas do Alentejo. Em termos qualitativos, a acumulação dos compostos fenólicos nas películas foi muito marcada pelo rendimento, bem como pelas condições meteorológicas do ano, verificando-se valores mais baixos nas parcelas mais a Sul.

Existe um potencial muito distinto entre os bagos das diferentes parcelas e nas duas castas em análise, assim como dos vinhos originados, reflexo da influência que as características edafo-climáticas e a própria tecnologia vitícola têm sobre os compostos fenólicos e estes sobre as características organolépticas dos vinhos, diferenças essas comprovadas pelos resultados físico-químicos e pela análise sensorial dos vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOULTON R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**: 67-87.
- CASTRO R., GOMES C., RODRIGUES C., CASTRO J., ALBERTO S., RIBEIRO F., RODRIGUES A., BAPTISTA M. A., BOTELHO M., CRUZ A. (2007b). Potencial de maturação da casta touriga nacional em diferentes itinerários tecnológicos e regiões (Dão, Bairrada e Vinhos Verdes) *In: 7º Simpósio de Viticultura do Alentejo*. Évora.
- DE FREITAS, V. A. P., MATEUS, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*(2), 940-945.
- DONÈCHE B. (1992). Botrytized Wines. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Granam H. Fleet (ed.), Harwood Academic Publishers, p. 327-351.
- HUGLIN P., 1978. Nouveau mode de devaluation des possibilités héliothermiques dun milieu viticole. *In: C. R. Acad. Agr. France*, **64** (13): 1117-1126.
- MAGALHÃES N. (1989). Aspectos do vingamento em *Vitis Vinifera* L.. Dissertação de doutoramento, UTAD, Vila Real;
- O.I.V, 2010. Recueil des methodes internacionales d'analyse des vins et des moûts, Office International de la vigne et du vin, Paris
- SOMERS T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, **10**:2175- 2186.
- SOMERS T.C.; EVANS M.E. (1974). Wine quality. Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agric.*, **25**: 1369-1379
- TONIETTO J.; CARBONNEAU A (2004) "Multicriteria climatic classification system for grapegrowing regions worldwide", *Agricultural and Forest Meteorology* 124 (2004) 81-93



INFLUÊNCIA DO ENRELVAMENTO NO COMPORTAMENTO AGRONÓMICO E ENOLÓGICO DA CASTA ‘TRINCADEIRA’ NO ALENTEJO

Barroso¹, João M.; Vaz Freire, J.L.; Vaz Freire, M.

Na sequência de estudos anteriores, apresentam-se os resultados obtidos no ano de 2007, relativos à prática do enrelvamento em vinhas da região do Alentejo, associado à utilização da rega deficitária, avaliando-se o seu impacto ao nível da produção e qualidade, bem como ao nível do comportamento vegetativo da planta e alguns fenómenos fisiológicos associados, como a fertilidade dos gomos por exemplo.

Parece confirmar-se a significativa influência desta prática ao nível da redução do vigor nas plantas, o que pode ter um impacto significativo na produtividade em consequência do menor número de inflorescências diferenciadas. No entanto a utilização da rega ainda que deficitária, pode compensar este impacto, tornando a prática do enrelvamento uma técnica sustentável nas vinhas do sul, permitindo beneficiar de todas as outras vantagens deste sistema de manutenção do solo.

1 – INTRODUÇÃO

A prática do enrelvamento na cultura da vinha tem vindo a ganhar alguns aderentes no Alentejo, não só pela obrigatoriedade das regras de produção integrada do Ministério da Agricultura, mas também pelas vantagens que pode proporcionar ao nível da transitibilidade e conservação do solo. No entanto a utilização desta modalidade de manutenção do solo não é isenta de alguns problemas, pelo que importa estudar a sua viabilidade em diversas situações quer de solos quer de sistemas de cultura.

Na maioria dos ensaios com enrelvamento realizados em várias regiões, observou-se sempre uma redução do vigor das plantas, bem como da sua produtividade, em consequência da competição radicular sofrida pela vinha, sobretudo nas camadas mais superficiais do solo. Essa competição revela-se mais ao nível hídrico nos climas mais secos, e ao nível do Azoto nos climas menos secos (Tescic, D. 2007). Autores como Gullick et al (1994) referem ainda por exemplo para a Califórnia uma melhoria da estrutura do solo e infiltração da água, bem como do teor de matéria orgânica, e actividade biológica no mesmo.

¹ Universidade de Évora – Dep. Fitotecnia jmmb@uevora.pt

No entanto também existem referências que alertam para a insustentabilidade desta prática em regiões mais secas, pelo consumo extra de água que o enrelvamento provoca. Shultz e Lohnertz (2002) referem o abandono desta prática em algumas regiões da Alemanha e Van Huyssteen e Weber (1980) na África do Sul, o excessivo consumo de água que pode ser fatal em algumas castas. A existência de sistema de rega nas vinhas objecto de enrelvamento parece assim ser uma exigência mínima de viabilidade desta técnica.

Ao nível do impacto na qualidade dos vinhos as referências são geralmente positivas, o que está de acordo com o melhor equilíbrio fisiológico conseguido ao nível do funcionamento da copa da videira, havendo ainda assim alguns alertas sobre o perigo da carência de azoto em alguns mostos, provocado pela concorrência do coberto vegetal nas videiras.

A sustentabilidade da prática do enrelvamento entre linhas na vinha e o impacto que a mesma provoca na fisiologia da planta de videira e consequentemente no seu comportamento agrónomico, está muito dependente do tipo de espécies presente no enrelvamento, e das condições ambientais da região. Em regiões quentes e secas como o Alentejo, onde as chuvas de Primavera são muito irregulares e terminam cedo, a escolha de espécies que persistam no terreno e se adaptem às condições climáticas é um elemento importante desta prática. As consociações de gramíneas e leguminosas semeadas tendem a perder o equilíbrio em favor das primeiras, em virtude da dificuldade de compatibilizar a ressementeira natural das leguminosas com os cortes a realizar no coberto. Uma alternativa é utilizar apenas a infestação natural da vinha, embora nestes casos nem sempre se consiga uma boa cobertura do solo. Em algumas vinhas com muitos anos de aplicação de herbicidas também é por vezes difícil de encontrar um coberto natural equilibrado que sirva como relva.

As condições climáticas do Alentejo, onde as elevadas temperaturas no período de pós-floração em geral coincidem com uma ainda razoável disponibilidade hídrica no solo, determinam elevados crescimentos vegetativos, dificultando por vezes assim uma boa gestão da copa e a orientação para uma viticultura de qualidade. Este fenómeno é tanto mais evidente quanto maior for a capacidade utilizável dos solos, tornando-se necessário recorrer a técnicas de controlo do vigor das plantas. Nestas condições, a prática do enrelvamento, associada à rega durante o período inicial de maturação, pode constituir

uma das formas mais eficiente de conseguir o equilíbrio pretendido ao nível da copa das plantas.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

As observações foram efectuadas durante o ano de 2007 num ensaio na Herdade de Pinheiros (Fundação Eugenio de Almeida). O talhão da casta ‘Trincadeira’ foi plantado em 1998, enxertado em R99, com um compasso de 2,5 x 1,2 m e conduzido em cordão Royat bilateral. A vegetação é conduzida em plano simples ascendente com recurso a dois arames móveis e efectuada uma desponta a 1,70 do solo. O sistema de poda contemplou dois níveis de carga, C1 com 6 talões a dois gomos e C2 com 8 talões a 2 gomos cada, tendo sido efectuada após a floração uma regularização do número de cachos entre cargas. O ensaio com enrelvamento foi instalado em 2002.

O solo do ensaio é do tipo Pmg de textura arenosa-franca com um perfil utilizável de 100 cm e 56 mm de armazenamento potencial de água.

O sistema de rega é do tipo gota a gota com gotejadores à superfície de 3,7 l/h autocompensantes. A rega foi efectuada durante a noite de forma contínua com dotações de 18 mm uma vez por semana, desde 22 Junho (potencial de base de -0,4 MPa) até 6 de Agosto na modalidade R1, e de 10 de Julho (potencial de base de -0,6 MPa) até final de Agosto, uma semana antes da vindima, na modalidade R2.

A observação efectuada sobre varias zonas do ensaio permitiu identificar a seguinte composição florística do enrelvamento natural obtido até à data: *Juncus Sufonins* - 54%; *Alface Brava Menor* - 27%; *Bromus Bordeaceus* - 3%; *Silene* - 3%; *Rumex Obtusifolins* - 2.5%; *Trifolium Pratense* - 7%; *Trifolium Fragiterum L.* - 2%; *Hordeum Murinum L.* - 1%; *Medicago Sativa* - 0.5%.

Na Primavera, durante os meses de Abril e Maio até 15 de Junho foram efectuados apenas 3 cortes da relva natural, que permitiu controlar o seu crescimento. Nos tratamentos com mobilização, esta foi efectuada apenas superficialmente com recurso a vibrocultor.

O ensaio era composto por um factorial split plot em 4 talhões (quadro 1).

| Manutenção do solo | Rega | Carga |
|------------------------|-------------|------------------|
| Mobilizado | Sequeiro | 12 gomos /planta |
| Envelhecimento natural | R1 (108 mm) | 16 gomos /planta |
| | R2 (126 mm) | |

Quadro 1 – Dispositivo experimental do ensaio na Herdade de Pinheiros (FEA – Evora)

A fertilidade potencial foi observada utilizando o método de contagem indirecta do número de flores, segundo Carbonneau e Casteran (1979), imediatamente antes da floração. O vigor das cepas foi avaliado pelo peso da lenha de poda, e os restantes parâmetros relativos à produção foram avaliados à vindima num total de 15 plantas por unidade experimental.

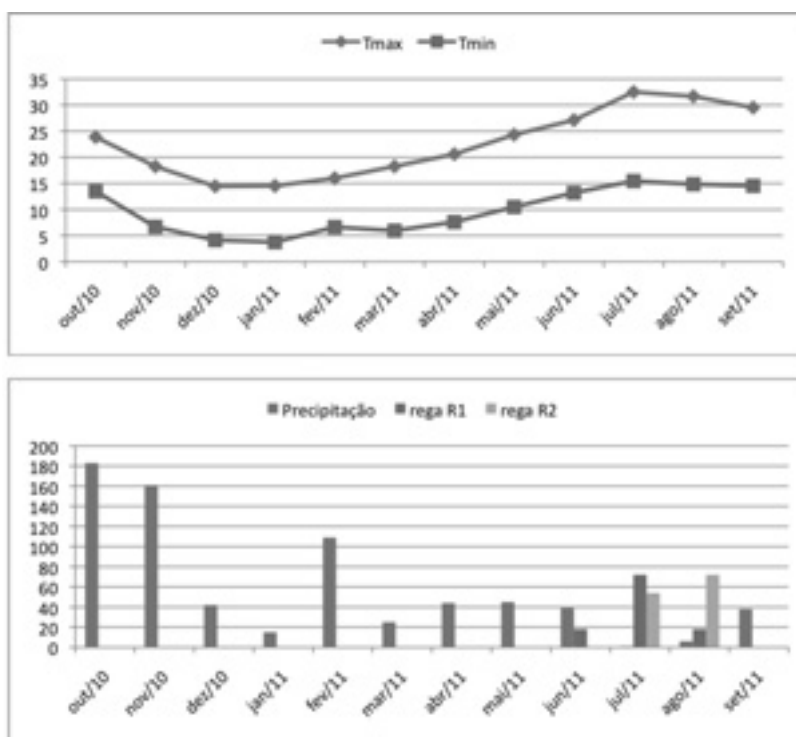


Fig. 1 – Elementos climáticos relativos ao local do ensaio (Evora- 2007). Em cima valores médios mensais da temperatura mínima e máxima. Em baixo valores da precipitação e da rega aplicada no ensaio.

O vigor anual ou seja a expressão vegetativa do ano foi avaliado pelo peso da lenha de poda, enquanto o vigor acumulado foi medido através do perímetro do tronco acima do ponto de enxertia.

A vindima foi realizada no mesmo dia em todos os talhões, e deu a origem a microvinificações apenas para os diferentes níveis dos factores enrelvamento e rega.

A análise estatística dos dados incluiu para além da análise de variância dos diferentes tratamentos dos ensaios e respectivas diferenças significativas, a utilização do teste LSD para separação de médias com intervalos a 95%.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quer em 2007 quer em 2008 o vigor das plantas avaliado pelo peso da madeira de poda, foi significativamente inferior nas parcelas sujeitas a enrelvamento, cerca de 25 % inferior (Fig. 2). Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos efectuados por outros autores em outras regiões (Palliotti et al, 2007; Tesic et al, 2007). A concorrência provocada pela relva na entre-linha ao nível da água e também dos nutrientes é a responsável por esta redução continuada de vigor das plantas, embora a capacidade de armazenamento do solo e as chuvas durante a Primavera, possam induzir resultados muito diferentes entre locais e mesmo entre anos diferentes. No ano de 2007 as chuvas de Inverno foram abundantes e ainda frequentes durante a Primavera (Fig. 1), no entanto a capacidade de armazenamento no perfil utilizável no solo do ensaio é relativamente reduzido, pelo que a concorrência da relva fez-se mesmo assim sentir de forma evidente. Quando observamos a interacção deste factor com os diferentes tratamentos de rega, podemos constatar que a redução de vigor é de facto mais acentuada nos talhões de sequeiro, que nos de rega deficitária R1 e R2, não deixando no entanto nunca de se fazer sentir. Os tratamentos de rega utilizados neste ensaio que no ano anterior (lenha 2007) não tinham sido suficientes para compensar a concorrência provocada pela relva no início do ciclo, revelaram-se neste ano (lenha 2008) responsáveis por um significativo aumento de vigor das plantas, sendo a rega mais precoce (R1), iniciada no final de Junho a que melhor compensou a perda de vigor observada no enrelvamento. Já na lenha de poda de 2007 (ciclo vegetativo de 2006) tinha sido a modalidade R1 a que mais fez subir o vigor nos tratamentos com relva. O início da rega parece assim ser uma questão crítica

na gestão do vigor das plantas sujeitas a enrelvamento, ainda que muito dependente da evolução das precipitações de Primavera. O mais rápido esgotamento da reserva de água no perfil do solo pode justificar alguma antecipação do início da rega em relação ao que é habitual nas situações de solo mobilizado. Contrariamente ao observado com a lenha de poda, as observações efectuadas à evolução do perímetro do tronco das plantas em 2008 (ciclo vegetativo de 2007), não permitiram concluir diferenças entre os dois tipos de manutenção do solo. O enrelvamento exerce um efeito depressivo mais evidente na expressão vegetativa das plantas e no respectivo crescimento dos ramos, porque se faz sentir logo muito cedo no ciclo, enquanto que a rega ao ser aplicada já próximo do pintor, vai influenciar mais a capacidade fotossintética das plantas com o respectivo impacto positivo ao nível da disponibilidade de hidratos de carbono, quer para os bagos quer para os ramos.

A fertilidade potencial observada (nº total de flores por gomo abrolhado) foi negativamente influenciada pelo enrelvamento, estando assim correlacionada com o respectivo menor vigor dos ramos observado nestes tratamentos (Fig.3). Já o mesmo não acontece com o factor rega, em que o maior vigor observado não induziu um aumento significativo da respectiva fertilidade potencial ao nível dos gomos latentes. Este resultado está de acordo com observado em anos anteriores neste e em outros ensaios com a casta 'Trincadeira', embora contrarie o observado em outras castas, onde a rega provoca sempre um aumento da fertilidade dos gomos. A explicação pode estar na mais precoce diferenciação floral desta casta que a torna indiferente a este tipo de rega tardia, no seu processo de diferenciação floral. A modalidade de rega R2 conseguiu ainda assim anular as diferenças induzidas pelo enrelvamento, tornando assim esta interacção significativa (Fig. 3). A menor fertilidade potencial observada no enrelvamento, manifesta-se sobretudo pela menor dimensão das inflorescências (fig.4), o que indica uma inibição mais evidente na duração do processo de diferenciação floral, do que propriamente no estágio inicial da mesma. Podemos de facto observar em 2007 que embora o número de inflorescências não tenha sofrido nenhum impacto quer com o enrelvamento, quer com a rega, a fertilidade avaliada pelo número de flores foi significativamente diferente, em virtude das inflorescências de maior dimensão (A e B) aparecerem em muito maior número que as pequenas (tipo C e D). A fertilidade dos gomos latentes, um dos principais factores da produtividade da videira, aparece pois como um dos aspectos críticos na prá-

tica do envelhecimento, e está de acordo com anteriores resultados deste ensaio. Em anos anteriores no entanto, nunca a rega após o pintor se tinha revelado suficiente para compensar o efeito negativo do envelhecimento, precisamente pela aparente maior precocidade desta casta no seu processo de diferenciação floral.

O impacto do envelhecimento sobre a produtividade, ainda que significativo, foi mais reduzido que o efeito observado ao nível do vigor dos ramos e da respectiva fertilidade dos gomos (Fig 6). Quando observamos a interação com a rega, é ainda mais visível o reduzido efeito do envelhecimento sobre a produção e no tratamento R2 ele anula-se por completo. A explicação para estes resultados estão na componente fertilidade potencial que também foi positivamente influenciada pela rega R2, e por alguma contribuição ao nível do engrossamento dos bagos proporcionada pela rega durante a maturação. A produção observada neste ensaio da casta ‘Trincadeira’ em 2007 só foi pois negativamente influenciada pelo envelhecimento praticado em sequeiro.

| | | Observ. à vindima | | Observações no vinho | | | |
|------|------------|-------------------|--------|----------------------|--------------|-------------------|------------|
| | | Peso 200 bagos | #Brix | Alcool provavel | Acidez total | Polifenóis totais | antocianas |
| solo | mobilizado | 522,4 a | 21,4 a | 12,3 a | 4,32 a | 26,7 a | 1073,8 a |
| | envelhado | 538,3 a | 22,4 b | 13,0 b | 4,12 a | 28,5 a | 1080,9 a |
| rega | R1 | 543,4 a | 22,0 a | 12,7 a | 4,13 a | 26,9 a | 1087,7 a |
| | R2 | 527,3 a | 22,1 a | 12,7 a | 4,24 a | 29,2 a | 1115,2 a |
| | sequeiro | 520,2 a | 21,7 a | 12,5 a | 4,30 a | 26,7 a | 1029,2 a |

Quadro 2 – Valores de alguns parâmetros qualitativos observados à vindima e no vinho

A utilização da rega deficitária durante os meses de Julho e Agosto teve um impacto mais significativo sobre parte vegetativa da planta na versão R1 (rega mais precoce), e maior sobre a parte produtiva na versão R2 (rega durante a maturação). No entanto a razão para este facto esteve mais do lado da dimensão dos cachos (inflorescências maiores) do que do lado do engrossamento dos bagos, o que pode ser mais difícil de explicar. Ainda assim só as maiores disponibilidades fotossintéticas da modalidade

R2 poderiam proporcionar um idêntico engrossamento do bago, com cachos de muito maiores dimensões. De facto como se pode observar no quadro nº 2 o peso à vindima de uma amostra de 200 bagos, não sofreu influência significativa quer do lado do enrelvamento quer da rega, mas na verdade trata-se de situações com diferentes numero de bagos em cada planta. Ou seja a não diferença é por si só já de um grande significado.

Relativamente à qualidade obtida não se observaram diferenças significativas em geral. Como se pode observar no quadro nº 2, apenas no ° Brix à vindima e respectivo álcool observado após vinificação, se pode observar um aumento significativo nos tratamentos com enrelvamento, resultado evidente da menor produção obtida.

4 – CONCLUSÕES

O enrelvamento natural utilizado na entre-linha mostrou um efeito evidente na redução da expressão vegetativa na casta ‘Trincadeira’ no Alentejo, bem como na fertilidade dos gomos latentes. Quando conjugada com a pratica da rega, ainda que deficitária, este menor vigor dos ramos, não foi no entanto suficiente para reduzir significativamente a produção das plantas. A rega durante a maturação, sobretudo se utilizada durante o mês de Agosto, teve uma influencia positiva nas diferentes componentes da produção, o que permitiu obter produtividades idênticas em plantas de expressão vegetativa bem diferente. Estes resultados permitem antever a possibilidade de com recurso a estas práticas culturais se poder obter copas mais equilibradas e eficientes, sem perdas ao nível do rendimento quer quantitativo quer qualitativo. O enrelvamento constitui um importante travão ao excessivo crescimento vegetativo durante os meses de Maio e Junho, e a rega deficitária uma ajuda indispensável para o funcionamento da copa durante o Julho e Agosto. O tipo e profundidade do solo é um outro factor que pode alterar significativamente estes resultados e deve ser sempre ponderado em cada situação concreta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gulick, S.H., D.W Grimes, D.S. Munk, D.A. Goldhamer, (1994) – Cover-crop-enhanced water infiltration of a slowly permeable fine sandy loam. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 1539-1546.
- Palliotti, A; Cartechini, A; Petoumenou, D.; Silvestroni, O; Mattioli, S; Berrios, J.G. (2007)- Long-term of seeded cover-crop on vegetative characteristics, Yield and grape and wine composition of ‘ Grechetto’ grapevines in Central Italy, *Proc. Intl WS Grapevine , Acta Horticulturae* n° 754.
- Schultz, H.R. ; Lohnertz, O. (2002) – Cover crop use in Germany and possible effects on wine quality. *Mondiaviti Bordeaux*, France
- Van Huyssteen, L. H,W. Weber (1980) – The effect of selected minimum and conventional tillage practices in vineyard cultivation on vine performance. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1(2):77-83.

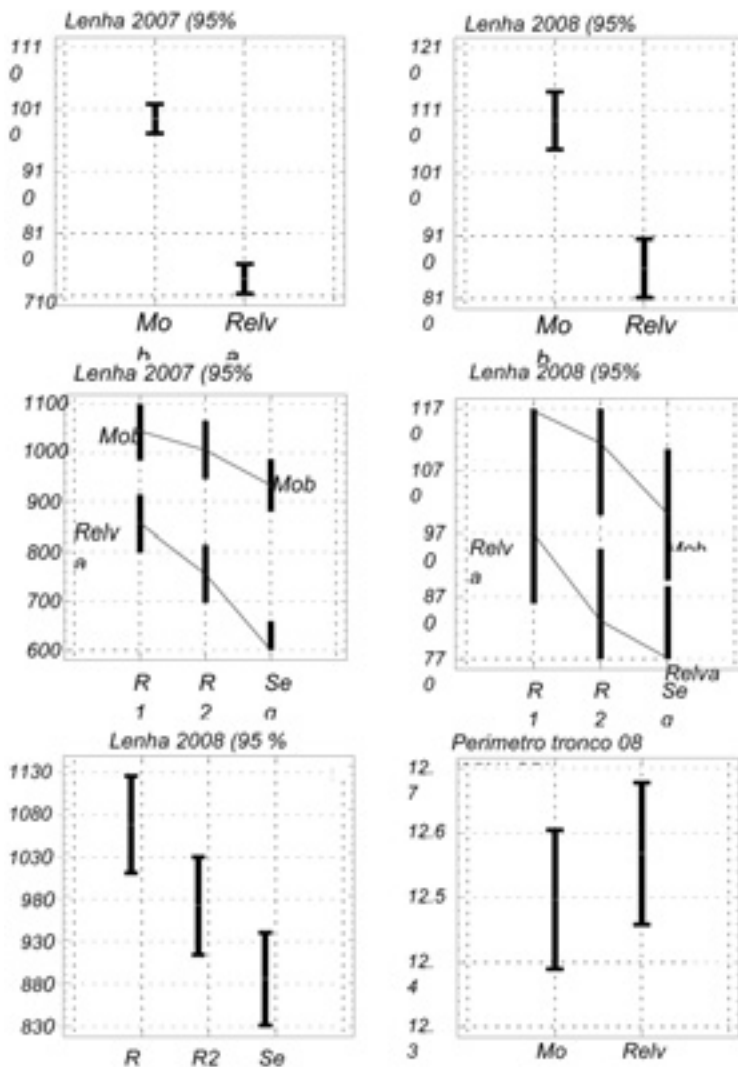


Fig 2 – Vigor anual avaliado pela lenha de poda nos diversos tratamentos, e perímetro do tronco nos tratamentos de manutenção do solo

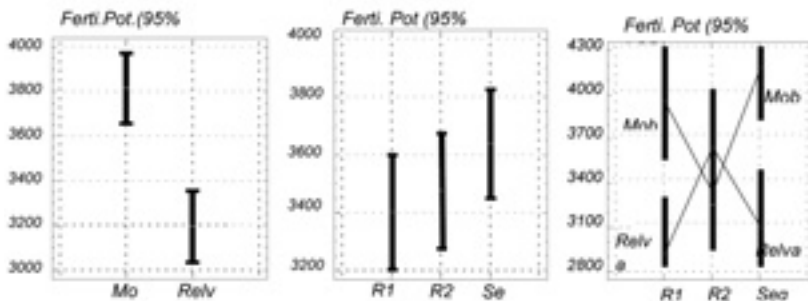


Fig 3 – Fertilidade potencial (flores por gomo abrolhado) observada na "Trincadeira" em 2007

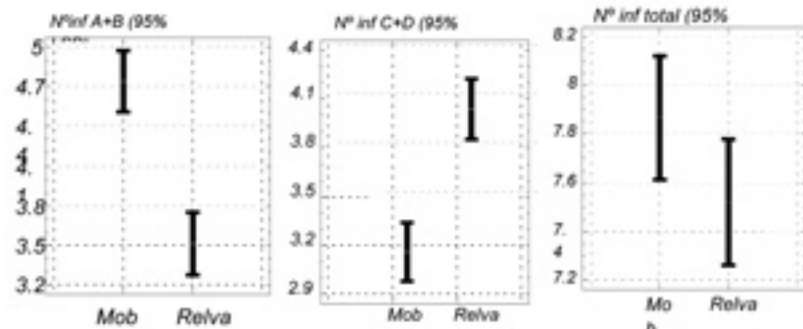


Fig 4 – Nº de inflorescências observadas por gomo abrolhado segundo o tipo de manutenção do solo

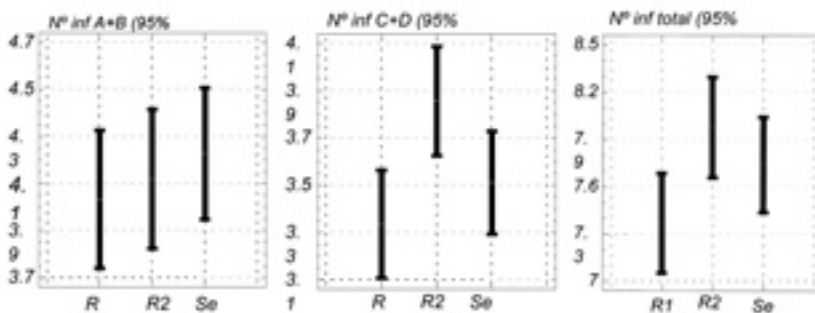


Fig 5 – Nº de inflorescências observadas por gomo abrolhado nos diversos tratamentos de rega

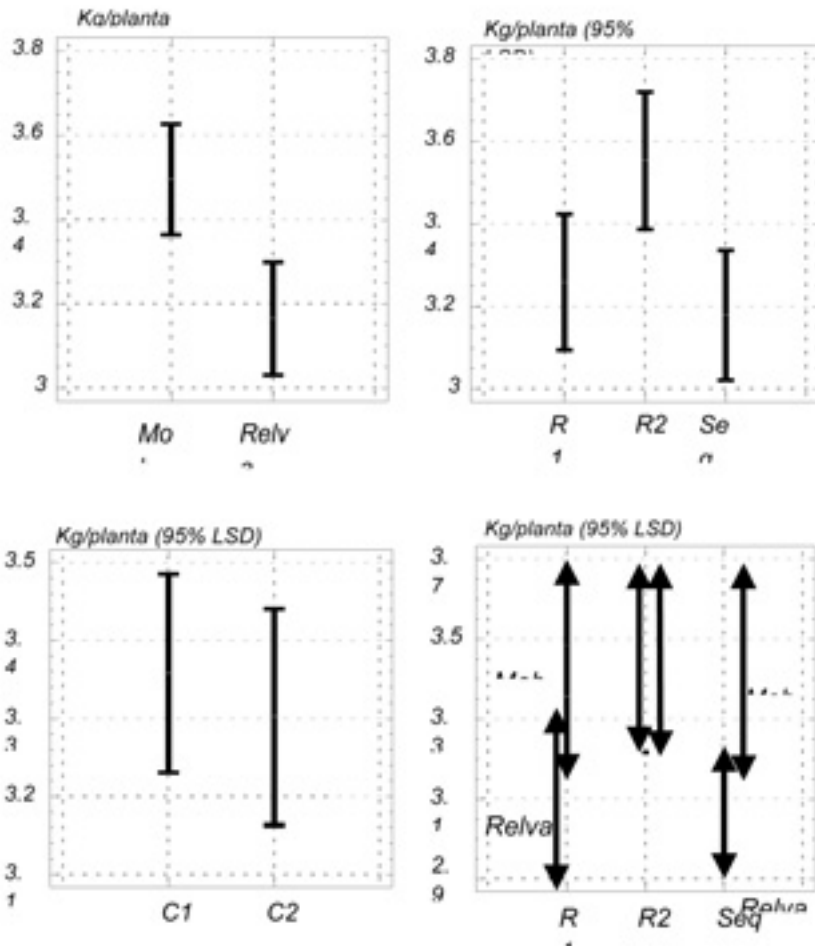


Fig. 6 - Produção obtida por planta em 2007, segundo os diferentes tratamentos

PODA MECÂNICA NA VINHA EFEITOS NO RENDIMENTO E NA QUALIDADE

Rogério de CASTRO(1); Aurélio CLARO(2); Ana RODRIGUES(2) António TEIXEIRA(3); José MACHADO(3); Chiara PIOVENE(1,4); Amândio CRUZ(1)

RESUMO

Nas campanhas de 2008 e 2009 foram realizados ensaios comparando poda mecânica (MEC=poda em sebe) com poda manual (MAN), na região do Dão, em duas castas – Alfrocheiro e Touriga Nacional em Carregal do Sal e Touriga Nacional em Nelas. Os diferentes tipos de poda já haviam sido introduzidos na campanha de 2007.

Os resultados obtidos, revelaram o mesmo sentido em ambos os anos na casta Alfrocheiro. O rendimento da MEC foi mais do dobro da MAN e muito similar ao nível da qualidade (teor alcoólico e componentes da cor). Na Touriga Nacional também em Carregal do Sal, a MEC originou rendimento superior (ca. quatro vezes) sem diferença apreciável ao nível da qualidade do mosto e do vinho (grau alcoólico, antocianinas e intensidade da cor).

No caso da Touriga Nacional em Nelas, a MEC originou rendimento superior nas duas campanhas (2008: 6,9 vs 2,4 t/ha; 2009: 16,6 vs 11,7 t/ha) e sem diferenças relevantes ao nível da qualidade em 2008 (grau alcoólico a rondar os 14 %V/V, acidez total, pH e intensidade corante). Já em 2009, na MEC verificou-se ligeira quebra do grau álcool (13,7 vs 15,2 %V/V), porém observou-se o contrário na intensidade da cor (eventualmente devido à menor dimensão dos bagos na MEC).

O elevado rendimento na poda mecânica deve-se sobretudo ao maior número de cachos e à ausência de desavinho, fenómeno muito marcado na MAN, em especial na casta Touriga Nacional, sobretudo em 2008.

Na poda mecânica, em todos os casos, verificou-se uma redução significativa do vigor (peso médio do sarmento e área foliar).

Palavras chave: mecanização da poda, vigor, rendimento, qualidade da uva e do vinho.

¹ INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, (rcaastro@isa.utl.pt)

² DÃO SUL – SOCIEDADE VITIVINÍCOLA, S.A. (aurelioclaro@daosul.com)

³ SOC. DOS VINHOS BORGES, S.A. (a.teixeira@vinhosborges.pt)

⁴ UNIVERSITA DI BOLOGNA (chiara.piovene@gmail.com)

1-INTRODUÇÃO

1.1 - Poda mecânica

Tendo em conta a actual vulgarização da vindima mecânica podemos considerar a poda como a operação que mais tempo consome na actividade vitivinícola [6, 10, 13, 14, 16, 17, 19]. Em Espanha [10] foi verificado que a poda ocupa aproximadamente 30% das necessidades totais de mão-de-obra e em Itália [6] verificaram que a poda requer cerca de 36% das necessidades totais de mão-de-obra.

A motivação conducente à pesquisa sobre sistemas de mecanização da poda foi diversa mas a redução ou optimização de custos era um objectivo transversal [1, 2, 5, 14, 15, 16, 17], associado à escassez e elevado custo da mão-de-obra especializada.

A adopção de sistemas de poda mecanizada em diversas regiões e condições não teve um impacto negativo na qualidade do vinho, excepto onde as produções excederam a capacidade produtiva das videiras [3].

1.2 - Poda em Sebe

De uma forma geral as videiras podadas em sebe apresentam como características típicas: uma maior carga à poda [5, 7, 10, 13, 18, 19], maior número de pâmpanos [4, 5, 10, 11, 15], desenvolvimento precoce da área foliar [10, 18], obtenção de maior área foliar total [10], maior número de cachos [5, 15] e maior produção [2, 5, 7, 10, 15] apesar de apresentarem valores inferiores em alguns indicadores relevantes como por exemplo: a taxa de abrolhamento [7, 13, 18], o índice de fertilidade [4, 7, 11] e o peso dos cachos [5, 15].

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Soc. dos Vinhos Borges, SA.

No ensaio realizado na Quinta da Agueira (Agueira, Nelas) comparou-se em 2008 e 2009, a poda manual com a poda mecânica em sebe no sistema de condução LYS e na casta Touriga Nacional enxertada em 1103P em 1997. A parcela tem uma área de 2,8ha apresentando exposição Sul, orientação das linhas Norte – Sul e um declive de aproximadamente 6%. O compasso de plantação é de 3 x 1 m (3333 cepas/ha).

Ao longo do ciclo vegetativo de 2008 foram registados os seguintes dados: carga à poda, abrolhamento, fertilidade, área foliar, potencial hídrico foliar, bagos para carac-

terização da maturação e rendimento. Numa amostra de 36 sarmentos foi medida em duas datas a área foliar (AF) pelo método proposto por [9] e o potencial hídrico foliar foi avaliado ao longo do ciclo num amostra de 48 folhas adultas em cada data, durante a madrugada (Ψ_{fb}) e ao meio dia solar (Ψ_{fm}) com recurso a uma câmara de pressão do tipo “Scholander”.

A vindima foi realizada mecanicamente e as uvas vinificadas em separado por tipo de poda

O desenho experimental é do tipo blocos casualizados com duas repetições.

2.2-Dão Sul - Soc. Vitivinícola, SA.

Os dados apresentados dizem respeito às campanhas de 2008 e 2009, recolhidos numa vinha com as castas Alfrocheiro e Touriga Nacional, em Carregal do Sal (40°25'40"N; 7°59'40" W; 400m de altitude), situado na Região Demarcada do Dão. A vinha foi enxertada sobre 1103P em 1991 e o compasso é de 2,5mx1,2m (3.333 plantas/ha), sendo a orientação das linhas N-S. A vegetação é conduzida em monopiano ascendente (MA) assente num cordão Royat bilateral.

O delineamento experimental é do tipo blocos casualizados com três repetições.

Em ambos os locais, o clima é segundo Thorntwaite, sub-húmido seco, mesotérico, com moderado excesso de água no Inverno e nula ou pequena concentração da eficiência térmica na estação quente, a que corresponde a fórmula climática C1B'3sa'. O solo enquadra-se no agrupamento principal dos Cambissolos (FAO/UNESCO), é de origem granítica, franco-arenoso, com reacção ácida e baixa reserva hídrica.

Em ambas as empresas (Vinhos Borges e Dão Sul), os ensaios haviam sido instalados em 2007. A poda em sebe foi efectuada pela passagem de uma pré-podadora à altura das unidades de frutificação, sendo posteriormente efectuada uma ligeira correcção manual dos sarmentos que pela sua posição não eram cortados pela máquina.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Soc. dos Vinhos Borges, SA.

3.1.1-Rendimento e suas componentes

Em 2008, a carga à poda, a percentagem de abrolhamento (% Abrol.), o índice de fertilidade potencial (IFpot) e o número de cachos são significativamente diferentes entre os dois tipos de poda (quadro 1). O peso por cacho é tendencialmente maior na MAN, tal como a relação área foliar por grama de uva.

Quadro 1 – Componentes do rendimento, Touriga Nacional, Nelas, 2008. Significância: * para $p \leq 0.05$, ** para $p \leq 0.01$, *** para $p \leq 0.001$ e n.s. não significativo pelo teste F.

| <i>Touriga Nacional</i> | MAN | MEC | Sig. |
|--------------------------------------|------|-------|------|
| Carga poda | 11.5 | 95.8 | *** |
| N.º unidades de frutificação | 4.29 | 23.78 | *** |
| N.º de olhos/unidade de frutificação | 2.72 | 4.03 | *** |
| % Abrolhamento | 80.3 | 46.4 | *** |
| Índice de fertilidade potencial | 1.75 | 1.30 | *** |
| AFig uva | 19.2 | 17.0 | - |

O rendimento foi sempre superior na MEC, resultado de maior número de cachos (quadro 2). Resultados similares foram também verificados por outros autores [7, 10, 18]. Por sua, em 2009, o número de varas/cepa foi superior na MEC, mas observou-se acentuada perda de vigor (peso médio da vara).

Quadro 2 – Componentes de rendimento e de vigor, Touriga Nacional, Nelas, 2008 e 2009. Significância: * para $p \leq 0.05$, ** para $p \leq 0.01$, *** para $p \leq 0.001$ e n.s. não significativo pelo teste F.

| Ano | Modalidade | N.º cachos/cepa | Peso /cacho (g) | Rend (t/ha) | N.º varas/cepa | Peso/vara (g) |
|------|------------|-----------------|-----------------|-------------|----------------|---------------|
| 2008 | MAN | 16,0 | 44,4 | 2,4 | - | - |
| | MEC | 57,7 | 35,6 | 6,9 | - | - |
| | Sig. | *** | ns | ns | - | - |
| 2009 | MAN | 38,9 | 89,0 | 11,7 | 13,0 | 43,7 |
| | MEC | 68,0 | 74,3 | 16,6 | 41,9 | 14,4 |
| | Sig. | *** | *** | *** | *** | *** |

3.1.2-Regime Hídrico

Relativamente ao potencial hídrico foliar de base não se registaram diferenças significativas entre as modalidades para qualquer medição ao longo do ciclo vegetativo de 2008 (Fig. 1a). É ainda de referir que os valores verificados se encontram de acordo com o descrito por outros autores [7, 8, 12]. O mesmo não se verificou com o potencial hídrico foliar mínimo (Fig. 1b), uma vez que nas duas últimas medições a MEC originou valores significativamente inferiores à MAN, diferença que pode ser explicada pela maior área foliar nessa modalidade que contribuirá para uma maior evapotranspiração. Ainda assim em nenhum dos casos são atingidos valores considerados de stress hídrico severo referidos na bibliografia [12].

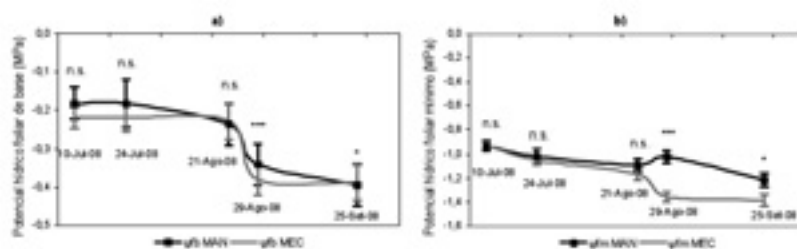


Figura 1 – a) Potencial hídrico foliar de base (ψ_{fb}). b) Potencial hídrico foliar mínimo (ψ_{fm}) ao longo do ciclo, Touriga Nacional, Nelas, 2008. Média \pm epm (n = 32 MAN, n = 16 MEC). Significância: * para $p \leq 0.05$, ** para $p \leq 0.01$, *** para $p \leq 0.001$ e n.s. não significativo pelo teste F.

3.1.3-Área Foliar (AF)

Os diversos parâmetros da AF (2008) apresentaram diferenças significativas entre modalidades (Fig. 2). A AF principal/sarmento é significativamente superior na MAN, resultado de folhas maiores. A AF secundária (AFsec) é também bastante superior na MAN. Apesar da maior AFprinc/sarmento e AFsec/videira, ao nível da área foliar total por videira, verifica-se o inverso, sendo a área foliar total da MEC visivelmente superior à da MAN, resultado do maior número de sarmentos observado nesta modalidade [7]. A área das folhas principais segue um padrão análogo ao da área foliar principal por pântano e ao da área foliar secundária, sendo bastante maior na MAN relativamente à MEC.

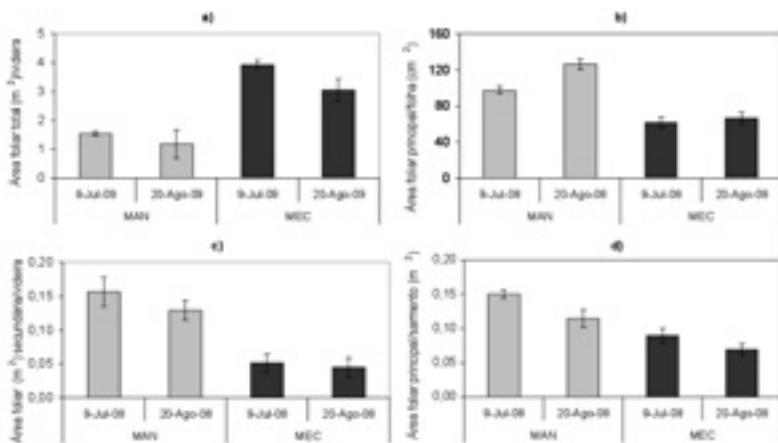


Figura 2 – a) Área foliar total (m²)/videira. b) Área foliar (cm²)/folha principal. c) Área foliar secundária (m²)/videira d). Área foliar principal (m²)/sarmento. Touriga Nacional, Nelas, 2008. Média ± epm (n = 24 MAN, n = 12 MEC).

3.1.4-Vinho

O teor alcoólico foi tendencialmente menor na MEC, sobretudo em 2009, sendo similares a acidez total, pH e intensidade corante (quadro 3). Pelo seu teor alcoólico todos os vinhos poderão enquadrar qualquer das categorias de vinho de qualidade produzido em região demarcada (VQPRD) do Dão.

Quadro 3 – Análise físico-química do vinho. Touriga Nacional, Nelas, 2008 e 2009.

| ANO | PODA | Teor Alcoólico | Ac. Total | pH | Intensidade da cor |
|------|------|----------------|-----------|------|--------------------|
| 2008 | MAN | 14,2 | 8,3 | 3,41 | 25,9 |
| | MEC | 13,8 | 8,1 | 3,41 | 27,7 |
| 2009 | MAN | 15,2 | 6,8 | 3,82 | 11,2 |
| | MEC | 13,7 | 7,1 | 3,72 | 12,9 |

3.2-Dão Sul – Soc. Vitivinícola, SA.

3.2.1-Rendimento e suas componentes

Na Touriga Nacional a MEC originou rendimento cerca de 4 a 6 vezes superior à MAN. Esta diferença deve-se ao número de cachos por cepa (2008) e também ao peso médio do cacho (2009). Em 2008, a inexistência de diferenças ao nível do peso/cacho deve-se essencialmente à elevada taxa de desavinho observada na MAN, fenómeno inexistente na MEC (quadro 4). Na casta Alfrocheiro, a MEC apresentou rendimento cerca do triplo da MAN (quadro 5). Esta diferença deve-se ao maior número de cachos na MEC, pois os cachos são unitariamente mais leves, resultado da auto-regulação da planta, fenómeno também verificado por [5, 10] nas castas Cabernet Sauvignon e Grenache respectivamente.

Quadro 4 – Componentes do rendimento e do vigor da casta Touriga Nacional, Carregal do Sal, 2008 e 2009. Significância: * para $p \leq 0.05$, ** para $p \leq 0.01$, *** para $p \leq 0.001$ e n.s. não significativo pelo teste F.

| Ano | Modalidade | Nº cachos/cepa | Peso/cacho (g) | Rendimento (t/ha) | Nº varas/cepa | Peso/vara (g) |
|------|------------|----------------|----------------|-------------------|---------------|---------------|
| 2008 | MAN | 12,9 | 48,2 | 2,1 | 17,3 | 78,1 |
| | MEC | 87,5 | 46,7 | 13,5 | 48,2 | 16,5 |
| | Sig. | *** | n.s. | *** | *** | *** |
| 2009 | MAN | 21,2 | 80,8 | 5,7 | 14,4 | 94,1 |
| | MEC | 109,4 | 60,5 | 21,9 | 45,6 | 12,5 |
| | Sig. | *** | *** | *** | *** | *** |

Quadro 5 – Componentes do rendimento e do vigor da casta Alfrocheiro, Carregal do Sal, 2008 e 2009. Significância: * para $p \leq 0.05$, ** para $p \leq 0.01$, *** para $p \leq 0.001$ e n.s. não significativo pelo teste F.

| Ano | Modalidade | Nº cachos/cepa | Peso/cacho (g) | Rendimento (t/ha) | Nº varas/cepa | Peso/vara (g) |
|------|------------|----------------|----------------|-------------------|---------------|---------------|
| 2008 | MAN | 25,8 | 97,1 | 8,3 | 18,8 | 47,1 |
| | MEC | 76,5 | 80,2 | 19,6 | 41,7 | 14,2 |
| | Sig. | *** | ** | *** | *** | *** |
| 2009 | MAN | 21,9 | 88,1 | 6,4 | 13,0 | 46,0 |
| | MEC | 90,2 | 64,5 | 19,3 | 36,1 | 9,7 |
| | Sig. | *** | *** | *** | *** | *** |

O número de sarmentos por videira é significativamente diferente entre os dois tipos de poda e em ambas as castas, sendo superior na MEC, resultado da maior carga à poda. Como resultado do maior número de sarmentos, verificou-se uma acentuada quebra de vigor, manifestado por sarmentos unitariamente mais leves.

3.2.2-Vinho

A pequena diferença nos parâmetros físico-químicos da uva, reflectiu-se nos vinhos elaborados, que se revelaram semelhantes em termos analíticos. O teor alcoólico foi genericamente elevado em ambas as castas e anos, sendo tendencialmente mais elevado na MAN na casta Alfrocheiro, verificando-se o contrário na Touriga Nacional (quadro 6).

Quadro 6 – Características analíticas dos vinhos das castas Alfrocheiro e Touriga Nacional, Carregal do Sal, 2008 e 2009.

| ANO | PODA | <i>Alfrocheiro</i> | | <i>Touriga Nacional</i> | |
|------|------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | | Teor Alcoólico (% vol.) | Intensidade cor | Teor Alcoólico (% vol.) | Intensidade cor |
| 2008 | MAN | 16,4 | 7,5 | 14,5 | 13,4 |
| | MEC | 14,9 | 7,9 | 15,2 | 13,7 |
| 2009 | MAN | 16,4 | 11,6 | 14,3 | 10,6 |
| | MEC | 15,2 | 11,1 | 14,8 | 9,3 |

4-CONCLUSÕES

A poda mecânica origina naturalmente uma maior carga à poda associada a um maior número de unidades de frutificação. A percentagem de abrolhamento foi menor na poda mecânica, tal como o índice de fertilidade. O potencial hídrico foliar de base não reflectiu em qualquer das medições uma condição de stress hídrico severo.

A área foliar total é significativamente maior na poda mecânica, enquanto que a área foliar por sarmento e a área foliar secundária, são significativamente superiores na poda manual.

O rendimento da poda mecânica foi significativamente superior, em todos os casos (local, casta e ano).

De modo geral o peso unitário do cacho foi inferior na poda mecânica, tal como a relação entre a área foliar e a produção.

A poda mecânica originou redução acentuada do vigor nos dois locais e nas diferentes castas e anos.

Os resultados das duas campanhas (2008 e 2009) sugerem a viabilidade da poda mecânica, com redução de mão-de-obra, ganhos de rendimento e com elevada qualidade, mas recomendam cautela no controlo do vigor das plantas – tendência para excessiva perda de vigor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSEN, P.C.; SIMS, C.A.; HARRISON, J.M. (1996). Influence of simulated mechanized pruning and and pruning on yield and berry composition of *Vitis rotundifolia* Noble and Welder. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47(3)
2. CLINGELEFFER, P.R. (1988). Response of Riesling clones to mechanical hedging and minimal pruning of cordon trained vines (MPCT) - Implications for clonal selection. *Vitis* 27. 87 - 93
3. CLINGELEFFER, P.R. (2000). Mechanization of wine and raisin production in Australian vineyards. *Proceedings of the ASEV 50th anniversary annual meeting, Seattle, Washington*
4. EGIPTO, R.J.L. (1997) Influência da mecanização da poda no comportamento agronómico e fisiológico da videira (*Vitis vinifera* L.), casta "Cabernet sauvignon". Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomias - Universidade Técnica de Lisboa
5. FREEMAN, B.M.; CULLIS, B.R. (1981). Effect of hedge shape for mechanical pruning of *Vinifera* vines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 32(1)
6. INTRIERI, C.; PONI, S. (1995). Integrated evolution of trellis training systems and machines to improve grape quality and vintage quality of mechanized Italian vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46(1)
7. LOPES, C.; LAUREANO, M.; FONSECA, B.; ALEIXO, A.L.; CASTRO, R. (1995). Influência da poda mecânica na produtividade da videira, casta "Cabernet Sauvignon". *Actas 8as Jornadas GESCO, ADISA* (ed.), Lisboa, 354-361.

8. LOPES, C.; MELÍCIAS, J.; ALEIXO, A.; LAUREANO, O.; CASTRO, R. (2000). Effects of mechanical hedge pruning on growth, yield and quality of Cabernet Sauvignon grapevines. *Acta Horticulturae* 526
9. LOPES, C.; PINTO, P.A. (2005). Easy and accurate estimation of grapevine leaf area with simple mathematical models. *Vitis* 44(2), 55 - 61
10. MARTINEZ DE TODA, F.; SANCHA, J.C. (1999). Long term effects os simulated mechanical pruning on Grenache vines under drought conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50(1)
11. MELÍCIAS, J.J.C. (2002). Influência da poda mecânica no comportamento das castas "Cabernet sauvignon" e "Alicante bouchet". Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa
12. OJEDA, H. (2007). Rega qualitativa de precisão na vinha. *Enoforum 2007*. Piacenza, Itália. *Revista Internet de Viticultura e Enologia 2007*
13. PONI, S.; BERNIZZONI, F.; PRESUTTO, P.; REBUCCI, B. (2004). Performance of Croatian under short-cane mechanical hedging: a sucessfull case of adaptation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55(4)
14. POSSINGHAM, J.V. (1996) Factors affecting the quality of wine from minimally pruned grapevines. *Acta Horticulturae* 427
15. REYNOLDS, A.G. (1988). Response of Okanagan Riesling vines to training system and simulated mechanical pruning. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39(3)
16. ROSSEAU, J.; CARBONNEAU, A.; OJEDA, H. (2008) A poda mínima, um modo para reduzir os custos de produção?. *Revista Internet de Viticultura e Enologia* N.º 6
17. SHULTZ, H.R.; WEYAND, K.M. (2005). Minimal pruning systems for cool climate grapes production - past and future. *Proceedings XIV GESCO Symposium, Forschungsanstalt Geisenheim, Geisenheim, Alemanha, 23-27 Agosto 2005, Vol.1: 11-16.*
18. SMITHYMAN, R.P.; HOWELL, G.S.; MILLER, D.P. (1997). Influence of canopy configuration on vegetative development, yield, and fruit composition of Seyval blanc grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 48(4)
19. ZABADAL, T.J.; Vane, G.R.; Dittmer, T.W.; Ledebuhr, R.L. (2002). Evolution of strategies for pruning and crop control of Concord grapevines in Southwest Michigan. *American Journal of Enology and Viticulture* 53(3)

CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS E ENOLÓGICAS DA CASTA BAGA, EM DIFERENTES SISTEMAS DE CONDUÇÃO

Anabela ANDRADE¹; Amândio CRUZ³; M. António BATISTA²; A. DIAS-CARDOSO¹; Rogério de CASTRO³

RESUMO

Na Região Demarcada da Bairrada, compararam-se os efeitos do sistema de condução na resposta agronómica e enológica, da casta Baga, durante o ciclo vegetativo de 2007. As variáveis estudadas foram dois tipos de arquitectura do coberto vegetal (Monoplano Ascendente (MA) vs LYS) e quatro alternativas de monda (M1 – supressão dos ladrões do tronco e braço (sem monda de cachos); M2 – supressão dos ladrões do tronco e braço, com monda, ficando 1 cacho/sarmento ao bago de ervilha; M3 – supressão dos ladrões do tronco e braço, com monda, ficando 1 cacho/sarmento ao pintor e M4 – supressão dos ladrões do tronco e braço, com monda qualitativa a culminar no pintor).

O sistema LYS, com menores índices de fertilidade e de potencial hídrico foliar de base, indicadores de uma menor disponibilidade hídrica, e menores valores de fotossíntese líquida à maturação, originou rendimento similar ao MA. Os vinhos obtidos no LYS, apresentaram superior teor de TAP, antocianinas e polifenóis e foram organolepticamente mais apreciados. A monda de cachos induziu redução no rendimento, aumento do peso do cacho, aumento de concentração de açúcares, diminuição da acidez total dos bagos e vinhos sensorialmente melhor classificados.

Palavras – chave: Baga, sistema de condução, monda de cachos, ecofisiologia, rendimento, qualidade.

1 - INTRODUÇÃO

Dominante no encepamento tinto da Região da Demarcada da Bairrada, a casta Baga é caracterizada, de um modo geral, por um porte prostrado, elevada fertilidade, um forte vigor, maturação tardia e grande sensibilidade à podridão cinzenta. Porém sobre esta casta escasseia a aplicação de conhecimentos já disponíveis, assim como, a prossecução de estudos de consolidação de potencialidades genéticas da casta, de gestão da vegetação e de alternativas de estrutura permanente, aliados à necessidade de uma maior

¹ DRAP Centro (anabela.andrade@drapc.min-agricultura.pt)

² CAVES MESSIAS

³ INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, rcaastro@isa.utl.pt

sistematização das operações culturais. O presente trabalho teve por objectivo avaliar, durante o ciclo vegetativo de 2007, o efeito de diferentes sistemas de condução, nomeadamente a forma de base ou arquitectura da planta, sobre a ecofisiologia da planta, bem como sobre parâmetros do rendimento e da qualidade. No presente trabalho foram estudadas duas alternativas de condução (MA vs LYS) e 4 de monda de cachos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Incidindo sobre a cultivar Baga enxertada em 3309 C (*Riparia tomentosa* x *Rupprechtii* Martin), o estudo foi instalado em Janeiro de 2007, em plena Região Demarcada da Bairrada, na “Quinta do Valdoeiro” pertencente à empresa Caves Messias, localizada no concelho da Mealhada a 38° 82’ de Latitude Norte e a 9° 17’ de Longitude Oeste. O ensaio foi integrado numa vinha com de 2,1 ha, com orientação N – S e ligeiro declive, situada a cerca de 50 m de altitude, instalada em 1998, ao compasso de 2,5 m x 1,25 m (3200 plantas por hectare). O solo, argilo-calcário, caracteriza-se por uma textura pesada, um pH (H₂O) pouco alcalino, medianamente provido em potássio assimilável, pobre em fósforo assimilável, de elevada capacidade de troca catiónica e de elevado grau de saturação em bases. O clima da região onde se insere a vinha, segundo o balanço hídrico de Thornthwaite, é moderadamente húmido, mesotérmico, de deficiência moderada de água no Verão e medianamente temperado e chuvoso no Inverno (Cruz *et al*, 2001).

Sob um delineamento em “split-plot”, ensaiaram-se duas formas de condução – Monoplano ascendente (MA) e LYS (LYS) e quatro níveis de monda: M1 – supressão dos ladrões do tronco e braço (monda zero); M2 – supressão dos ladrões do tronco e braço (monda zero) + monda, ficando 1 cacho/sarmento ao bago de ervilha; M3 – supressão dos ladrões do tronco e braço (monda zero) + monda, ficando 1 cacho/sarmento ao pintor e M4 – supressão dos ladrões do tronco e braço (monda zero) + monda qualitativa a culminar ao pintor. A análise dos dados foi efectuada através dos programas Excel e Statistica 6.0: os parâmetros intrínsecos à evolução da maturação foram submetidos a cálculo de médias e respectivo erro padrão; os restantes resultados foram tratados estatisticamente com recurso ao teste de F para a análise de variância, e expressos como não significativos (ns), significativos para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). Sempre que a análise revelou diferenças significativas procedeu-se à comparação de médias com base no teste de Duncan e um nível de significância de 0,05.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Potencial hídrico foliar (Ψ_f)

Em ambas as formas de condução, LYS e MA, o potencial hídrico foliar (Ψ_f) de base foi naturalmente decrescente do pintor à colheita (Figura 1), traduzindo a redução de disponibilidades hídricas do solo ao longo da maturação das uvas e tomando à vindima valores baixos; em ambas as fases de avaliação, o LYS, evidenciou teores ligeiramente mais baixos que a forma MA. Considerando -0,4 MPa como o valor crítico considerado como uma limitação em termos hídricos à actividade metabólica das plantas (Deloire *et al.*, 2003), constata-se que ao pintor, LYS e MA, com valores de -0,30 e -0,26 MPa, desfrutavam de uma boa disponibilidade hídrica no solo, o que é compreensível face à precipitação ocorrida nos meses anteriores. Tal comportamento não se verificou à maturação em que, não obstante a ocorrência de precipitação em meados de Agosto e, também em Setembro, os valores do potencial hídrico foliar (Ψ_f) de base do LYS e do MA foram, respectivamente, -0,54 e -0,46 MPa – valores estes que segundo Ojeda (2001) são, à maturação, coadunáveis com vinhos de qualidade.

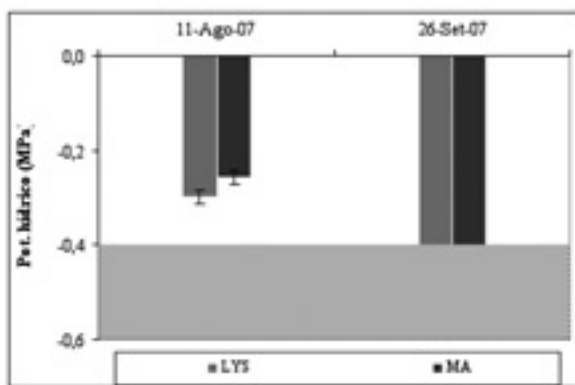


Figura 1. – Potencial hídrico foliar (Ψ_f) de base, ao pintor e à vindima. Sistemas de condução: LYS e MA. Média \pm erro padrão de 8 folhas por modalidade. Casta Baga, Bairrada 2007.

3.2 - Evolução da maturação e qualidade à vindima

A evolução do TAP (% v/v) por modalidade de condução/nível de monda, consta da Figura 2, dela ressaltando a detenção da maior acumulação de açúcares totais pela forma LYS, independentemente do nível de monda.

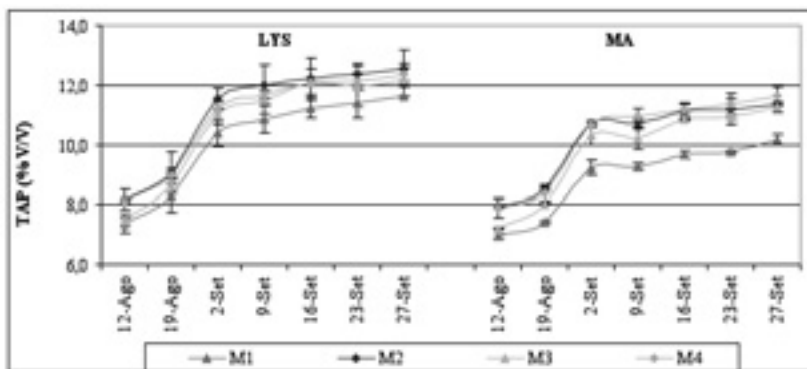


Figura 2.— Evolução, ao longo da maturação, do TAP, nas formas LYS e MA/nível de monda. Casta Baga, Bairrada, 2007.

Igualmente evidente é a influência do nível de monda, nas duas formas de arquitectura, pois que os valores correspondentes a M1 foram sempre inferiores aos dos restantes níveis de monda, não obstante a sua proximidade com M3 no primeiro controlo, facto compreensível pois que M3 representa a prática de monda exactamente ao pintor. Das Figuras 3 e 4 sobressai o contributo da forma LYS no aumento do teor de antocianinas e de polifenóis totais na ausência de monda, bem como o efeito favorável da monda sobre tais compostos determinantes na cor e sabor dos vinhos tintos.

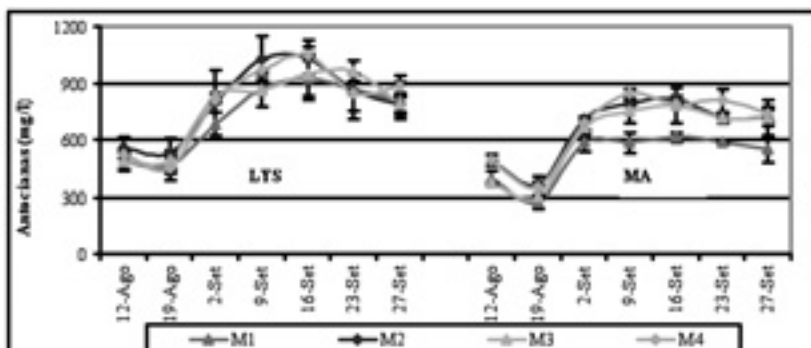


Figura 3. – Evolução, ao longo da maturação, do teor de antocianinas nas formas LYS e MA/nível de monda. Casta Baga, Bairrada, 2007.

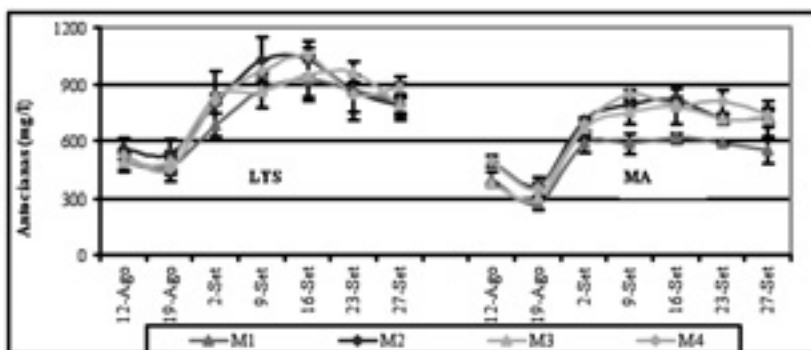


Figura 4. – Evolução, ao longo da maturação, dos polifenóis totais, nas formas LYS e MA/nível de monda. Casta Baga, Bairrada, 2007.

3.2.1 – Características dos mostos e dos vinhos

Da análise efectuada aos mostos e aos vinhos correspondentes às modalidades (8) submetidas a vinificação (Quadros 1 e 2), sobressai a diferença entre sistemas de condução (compare-se LYS M1 com MA M1), e a tendência da monda para favorecer, em ambos os sistemas, sobretudo no MA, parâmetros como o TAP e a acidez total. No Qua-

dro 3, os resultados da prova organoléptica corroboram os dados laboratoriais de mostos e vinhos.

Quadro 1. – Influência do sistema de condução e da supressão de cachos nos parâmetros analíticos do mosto à entrada da adega (28/09/2007). Valores médios por modalidade. Casta Baga, Bairrada, 2007.

| Parâmetros | Unidade | Lys M1 | Lys M2 | Lys M3 | Lys M4 | MA M1 | MA M2 | MA M3 | MA M4 |
|--------------|----------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Acidez total | Ac.tart. (g/L) | 5.7 | 5.5 | 5.4 | 5.2 | 6.2 | 5.5 | 5.6 | 5.4 |
| pH | --- | 3.2 | 3.23 | 3.23 | 3.24 | 3.15 | 3.26 | 3.21 | 3.26 |
| Acúcar total | g/L | 199 | 214 | 210.9 | 217.4 | 172.4 | 204.5 | 201.7 | 209.9 |
| Ácido málico | g/L | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.8 | 2.3 | 2.2 | 1.9 | 2.0 |
| Ácido | g/L | 4.6 | 4.7 | 4.6 | 4.5 | 4.8 | 4.5 | 4.4 | 4.6 |
| TAP | % v/v | 11.4 | 12.2 | 12.0 | 12.4 | 9.8 | 11.7 | 11.5 | 12.0 |

Quadro 2 – Influência do sistema de condução e da supressão de cachos nos parâmetros analíticos do vinho (análise efectuada em Outubro de 2007). Valores médios por modalidade. Casta Baga, Bairrada, 2007.

| Parâmetros | Unid | Lys M1 | Lys M2 | Lys M3 | Lys M4 | MA M1 | MA M2 | MA M3 | MA M4 |
|---------------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Massa volúmica | g/ml | 0.9943 | 0.9947 | 0.9944 | 0.9944 | 0.9951 | 0.9941 | 0.9939 | 0.9938 |
| TAV a 20° | % vol | 11.5 | 12.6 | 12.3 | 12.6 | 9.9 | 11.8 | 11.7 | 12.3 |
| Acidez volátil | Ac acét | 0.26 | 0.27 | 0.27 | 0.29 | 0.27 | 0.27 | 0.29 | 0.3 |
| Acidez total | Ac tart (g/L) | 7.7 | 8.3 | 8.1 | 8 | 7.7 | 7.7 | 7.9 | 7.9 |
| pH | --- | 3.4 | 3.37 | 3.38 | 3.39 | 3.31 | 3.44 | 3.35 | 3.4 |
| Antocianas | mg/L | 490 | 592 | 549 | 506 | 280 | 444 | 428 | 452 |
| Açúcares redutores | g/L | 2.2 | 4.4 | 3.7 | 4.3 | 2.4 | 2.0 | 2.1 | 2.2 |
| Extracto seco total | g/L | 29.4 | 33.9 | 32.2 | - | 26.9 | - | 29.2 | 30.8 |
| ÍPT (DO 280) | --- | 38 | 43 | 40 | 41 | 25 | 37 | 31 | 36 |
| Ácido málico | g/L | 2.6 | 2.7 | 2.7 | 2.6 | 2.5 | 2.6 | 2.5 | 2.7 |

| Modalidades/ Apreciação | Lys M1 | Lys M2 | Lys M3 | Lys M4 | MA M1 | MA M2 | MA M3 | MA M4 |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| global | 74 | 78 | 78 | 70 | 51 | 71 | 67 | 65 |

Quadro 3 – Apreciação organoléptica dos vinhos (prova realizada em Outubro de 2007).

3.3 - Rendimento e suas componentes

No tocante ao rendimento e suas componentes (Quadro 4), destaca-se que a forma de condução influenciou significativamente o número de cachos à vindima e o peso por cacho.

Quadro 4. - Influência do sistema de condução e da supressão de cachos no rendimento e suas componentes. Valores médios por sistema de condução, modalidade de monda e interacção sistema de condução x monda. Casta Baga, Bairrada, 2007.

| Factores | Nº cachos/cepa | Produção/ Cepa (Kg) | Peso/cacho (g) | Rendimento (t/ha) |
|----------|----------------|------------------------|----------------|----------------------|
| LYS | 17,2 | 4,55 | 267,6 | 14,6 |
| MA | 12,9 | 4,28 | 337,3 | 13,7 |
| Sig. | *** | ns | *** | ns |
| M1 | 20,9 a | 5,83 a | 279,5 b | 18,7 a |
| M2 | 13,2 b | 3,82 b | 294,8 b | 12,2 b |
| M3 | 14,2 b | 3,81 b | 280,6 b | 12,2 b |
| M4 | 12,0 c | 4,20 b | 355,0 a | 13,4 b |
| Sig. | * | *** | ** | *** |
| LYS M1 | 21,2 a | 5,22 ab | 246,4 b | 16,7 ab |
| LYS M2 | 15,6 b | 3,94 bc | 248,4 b | 12,6 bc |
| LYS M3 | 16,9 ab | 4,10 bc | 244,1 b | 13,1 bc |
| LYS M4 | 15,1 bc | 4,96 abc | 331,6 a | 15,9 abc |
| MA M1 | 20,7 a | 6,44 a | 312,7 ab | 20,6 a |
| MA M2 | 10,8 d | 3,71 bc | 341,7 a | 11,9 bc |
| MA M3 | 11,4 cd | 3,53 c | 317,1 ab | 11,3 c |
| MA M4 | 8,8 d | 3,44 c | 378,3 a | 11,0 c |
| Sig. | * | * | * | * |

Nota: Sig. Nível de significância; ns – não significativo ao nível de 0,05 pelo teste de F; * - significativo ao nível de 0,05; ** - significativo ao nível de 0,01; *** - significativo ao nível de 0,001. Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo teste de Duncan.

De facto, o LYS, com menores índices de fertilidade, deteve o maior número de cachos/planta, tendo diferido significativamente do MA: 17,2 vs 12,9 cachos/planta, respectivamente. Contudo, o peso médio do cacho foi menor no LYS e significativamente diferente do peso médio do cacho da forma MA; As produções por planta de ambas as formas, LYS e MA, com valores médios de 4,55 e 4,26 kg, respectivamente, não revelaram diferenças significativas e o rendimento, manifestou igual comportamento, sendo tendencialmente superior no LYS. A monda influenciou significativamente o número de cachos, a produção por planta e o peso por cacho: Concretamente, a M1 (supressão dos ladrões do tronco e braço (sem monda)) com o maior número de cachos por planta (20,9) e a maior produção por planta (5,83 kg) diferiu significativamente das restantes modalidades, sendo de destacar a M4 (supressão dos ladrões do tronco e braço e com monda qualitativa a culminar no pintor) com 12,0 cachos e uma produção de 4,20 kg/cepa. Esta modalidade com um peso por cacho de 355,0 g, diferiu significativamente das restantes as quais, com pesos de 279,5 (M1), 280,6 (M3) e 294,8 g (M2), não diferiram entre si. O maior rendimento verificou-se em M1 que com 18,7 t/ha diferiu das restantes modalidades de monda, sendo estas iguais entre si e com valores oscilando entre 13,4 (M4) e 12,2 (M2 e M3) t/ha. Os menores rendimentos foram obtidos pelas interacções LYSxM2 (12,6 t/ha), MAxM2 (11,9 t/ha), MAxM3 (11,3 t/ha) e MAxM4 (11,0 t/ha). A modalidade LYSxM4, com 15,9 t/ha, originou um rendimento superior a qualquer das interacções MAxM (com monda).

4 - CONCLUSÕES

Em ambas as formas de condução, o potencial hídrico foliar (Ψ_f) de base teve um comportamento decrescente do pintor à colheita, traduzindo a redução de disponibilidades hídricas do solo ao longo da maturação das uvas e tomando à vindima valores conducentes a vinhos de qualidade. O Monoplano Ascendente produziu bagos menos açucarados e mais ácidos, menos ricos em antocianinas e polifenóis totais, e observaram-se diferenças entre sistemas de condução no tocante aos valores de álcool provável, tendo o LYS originado os maiores valores de TAP (% v/v) e os vinhos sensorialmente mais apreciados. A monda de cachos provocou um menor rendimento, um aumento do peso do cacho, um aumento de concentração de açúcares e uma diminuição da acidez

total dos bagos, com reflexos mais evidentes nos vinhos do Monoplano Ascendente. As interacção LYSxM2 e LYSxM4 originaram o maior valor de TAP, sendo de realçar que o sistema LYS mesmo sem monda (M1) apresentou valores próximos de algumas modalidades mondadas no MA, mas com rendimento superior (ca. 50%). No *terroir* específico do ensaio, o LYS, sistema que proporciona elevada SFE, revelou condições ecofisiológicas favoráveis para produções elevadas aliadas a uma boa evolução dos bagos do pintor à vindima, o que confirma o potencial deste sistema em condições temperadas não devendo ser negligenciada a sua divulgação como ferramenta na obtenção de melhores resultados vitícolas numa casta que, sendo emblemática da Bairrada, é soberbamente conhecida como problemática.

5 - REFRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, A.; ALMEIDA, C.; FRADE, P.; RIBEIRO, F.; AIRES, A.; CASTRO, R. (2001) - “Controlo da produção e do vigor pela carga e intervenção em verde cv. Arinto, Bairrada.”, 5º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 23 - 25 de Maio, Évora, Vol. 1., p. 217 – 224.
- DELOIRE, A.; CARBONNEAU, A.; FEDERSPIEL, B.; OJEDA, H.; WANG, Z.; COSTANZE, P., 2003. La vigne et l'eau. Progrés Agricole et Viticole, 120, 4: 79-90.
- DO Ó-MARQUES J. N., 2003. Evolução de alguns parâmetros analíticos ao longo da maturação das uvas nas castas ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Tinta Roriz’ (Região da Estremadura): Influência de diferentes níveis de produção. Rel. Trab. Fim. Curso Eng. Agron., ISA/UTL, Lisboa, 65 pp.
- MARÍN, M.J., ARGUETA, M. S., RODRÍGUEZ, A.M., MONAGO, E. M. E DE MIGUEL, C. (2004). Influencia del aclareo de racimos en los frutos de las variedades Syrah y Tempranillo, cultivadas en parcelas inscritas en la D.O. Ribera del Guadiana (Extremadura-Espana). 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo: 38- 45, Évora.
- OJEDA, H. (2001). Bases ecophysiologicals et choix techniques dans la gestion de l'eau dans les vignobles d'Argentine. GESCO XII journées du groupe d'étude des systèmes de conduite de la vigne, Montpellier, France, 1, 75-86.



ESTRATÉGIAS DE GESTÃO DO COBERTO VEGETAL E DA PRODUÇÃO NA CASTA TOURIGA-NACIONAL NA REGIÃO DO DÃO

Carlos COSTA-RODRIGUES⁽¹⁾; Amândio CRUZ⁽¹⁾; Manuel BOTELHO⁽¹⁾
Carlos RODRIGUES⁽²⁾; Rogério de CASTRO⁽¹⁾

RESUMO

Entre 2004 e 2006, na região do Dão, numa vinha plantada em 1990 com a casta Touriga-Nacional, conduzida em MVA, avaliaram-se os efeitos de diferentes densidades de varas por metro de sebe (D23; D17; D11), de realizar, ou não, quer desfolha (F1; F0), quer monda ao pintor (M1; M0), no microclima do coberto, no rendimento e na qualidade da uva e do vinho. Nenhuma das intervenções provocou alterações significativas na expressão vegetativa, sendo possível produzir vinhos de qualidade para valores de lenha de poda até 1,0kg/m de sebe. A monda, a desfolha e a redução de D23 para D11 não se traduziram na melhoria de qualquer dos parâmetros qualitativos avaliados nos bagos à vindima, no mosto e no vinho. O rendimento foi elevado: 8,5 a 13,1t/ha em 2004; 10,2 a 16,4t/ha em 2005 e 12,2 a 17,9t/ha em 2006. A grande desvantagem verificada em D23 foi o tempo de poda, que aumentou de ≈ 30 hr/ha em D11 e D17 para cerca de 90hr/ha em D23. Os resultados obtidos, sugerem, como melhor estratégia para obter um produto que maximize produtividade e qualidade, efectuar a espoldra no tronco e braços, deixando cerca de 17 varas/m de sebe, sem desfolha e sem monda (D17F0M0).

Palavras-chave: Densidade de Varas, Desfolha, Monda Qualitativa de Cachos, Rendimento, Qualidade.

1- INTRODUÇÃO

A questão fundamental na viticultura é a relação do rendimento com a qualidade. Existe a convicção mais ou menos generalizada de que uma produção elevada se traduz em vinhos de menor qualidade. Mas será que a quantidade impede realmente a qualidade? E a ser verdade, relacionam-se proporcionalmente ou existe um patamar de qualidade, só decrescendo esta a partir de certo limiar quantitativo?

A relação causa/efeito entre rendimento e qualidade não está cientificamente bem sustentada, e as evidências de que a relação entre estes parâmetros é proporcional são

¹ INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, rcaastro@isa.utl.pt.

² DÃO SUL, SOC. VITIVINÍCOLA, SA, carlosrodrigues@daosul.com

limitadas e inconsistentes (Bravdo *et al.*, 1984) e principalmente baseadas em estudos efectuados em climas frios (com dificuldade em completar a maturação) ou em vinhas com produções excessivas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi instalado numa parcela de vinha da empresa *Dão Sul – Sociedade Vitivinícola, S.A.*, Concelho de Carregal do Sal, inserida na *Região Demarcada do Dão*. De acordo com a classificação climática de Thornthwaite, o clima desta região é sub-húmido seco, mesotérmico, com moderado excesso de água no Inverno e nula ou pequena concentração da eficiência térmica na estação quente, a que corresponde a fórmula climática $C_1B'_{3sa}$. O solo enquadra-se, segundo a classificação da FAO/UNESCO, no agrupamento principal dos *Cambissolos*. É um solo de origem granítica, franco-arenoso, com reacção ácida e baixa reserva hídrica.

A plantação do porta-enxerto 1103P foi efectuada em 1990, com compasso de 2,5m por 1,2m e com as linhas dispostas segundo a orientação NE-SW. As videiras da casta Touriga-Nacional foram enxertadas no ano seguinte, sendo a vegetação conduzida em Monoplano Vertical Ascendente (MVA) e assente num cordão Royat bilateral. A carga média deixada à poda foi de 24 olhos por videira (4 unidades de frutificação por cepa, cada uma com dois talões, um a 4 e outro a 2 olhos), correspondendo a cerca de 80.000 olhos/ha. A vinha não dispõe de qualquer sistema de rega.

O plano experimental foi delineado em *split-split-plot* com 3 repetições. Foram ensaiadas 3 densidades de varas (definidas ao estado G da escala de Baggiolini): 23, 17 e 11 varas por metro linear de sebe, respectivamente, D23, D17 e D11. Ao pintor foram introduzidas a desfolha e a monda qualitativa de cachos (excepto em 2004): F1, com desfolha; F0, sem desfolha; M1, com monda; M0, sem monda.

A descrição pormenorizada das metodologias usadas e do delineamento experimental pode ser consultada em Rodrigues (2009).

3- RESULTADOS

3.1 Caracterização da Estrutura do Coberto Vegetal

Ao nível da estrutura da sebe (quadro 1), observamos que a redução da densidade de varas e a realização da desfolha, levou ao decréscimo da densidade do coberto vegetal,

pela redução do número de camada de folhas (NCF) e da percentagem de folhas e cachos interiores. A desfolha foi mais eficaz a melhorar o microclima do coberto. A área foliar (AF) foi superior nos anos de maior disponibilidade hídrica (2004 e 2006), sendo igualmente nestes anos que a contribuição das netas para a AF total é superior, chegando a atingir 75%. A tendência para o desenvolvimento de uma maior área foliar secundária nas densidades mais baixas encontra paralelismo no número de netas por sarmento e relaciona-se com o vigor, avaliado pela massa unitária de cada sarmento. Em face dos resultados obtidos, julgamos que, nas nossas condições edafoclimáticas, para evitar a perda de radiação no solo e promover uma eficaz colonização do espaço aéreo em sistemas monopiano, o valor da SFE deverá situar-se próximo dos 13.000m²/ha, com um NCF entre 2 e 3.

Quadro 1- Efeito da densidade de varas, desfolha e monda na estrutura do coberto. NCF-número de camadas de folhas; F_{int}- folhas interiores; C_{int}- cachos interiores; AF_T- área foliar total; AF_S- área foliar secundária; SFE- superfície foliar exposta. Medições efectuadas à maturação em 2004, 2005 e 2006

| Ano | Tratamento | NCF | F _{int} (%) | C _{int} (%) | AF _T (m ² /cepa) | AF _S /AF _T (%) | SFE (10 ³ m ² /ha) |
|------|------------|--------|-------------------------|-------------------------|---|---|---|
| 2004 | D23 | 2,0 | 24 | 52 | 10,6 b | 63 | 10,7 ab |
| | D17 | 1,7 | 18 | 49 | 6,5 a | 69 | 10,4 a |
| | D11 | 2,1 | 24 | 51 | 8,0 ab | 77 | 11,2 b |
| | Sig. | ns | ns | ns | ** | ns | ** |
| | F0 | 2,8 | 33 | 71 | 8,0 | 66 | 11,1 |
| | F1 | 1,1 | 11 | 30 | 8,7 | 75 | 10,1 |
| | Sig. | *** | *** | *** | * | ns | *** |
| 2005 | D23 | 2,2 b | 27 b | 62 b | 7,0 | 38 | 12,1 b |
| | D17 | 2,1 ab | 25 ab | 52 ab | 5,7 | 50 | 11,4 a |
| | D11 | 1,7 a | 17 a | 43 a | 5,0 | 50 | 11,3 a |
| | Sig. | ** | * | *** | ns | ns | ** |
| | F0 | 2,6 | 37 | 68 | 6,8 | 47 | 12,1 |
| | F1 | 1,4 | 13 | 36 | 5,2 | 40 | 11,2 |
| | Sig. | *** | *** | *** | ns | ns | *** |
| 2006 | M0 | 2,2 | 26 | 58 | 6,7 | 42 | 11,8 |
| | M1 | 1,9 | 20 | 46 | 5,6 | 45 | 11,6 |
| | Sig. | * | * | ** | ns | ns | ns |
| | D23 | 2,5 | 27 | 42 | 12,4 b | 59 | 12,8 b |
| | D17 | 2,2 | 23 | 39 | 9,7 ab | 67 | 13,1 b |
| | D11 | 1,9 | 23 | 28 | 7,4 b | 64 | 12,2 a |
| | Sig. | ns | ns | ns | * | ns | * |
| 2006 | F0 | 2,5 | 29 | 41 | 10,3 | 63 | 12,8 |
| | F1 | 2,0 | 20 | 31 | 9,3 | 64 | 12,6 |
| | Sig. | ** | * | ns | ns | ns | ns |
| | M0 | 2,6 | 30 | 41 | 10,0 | 63 | 12,7 |
| | M1 | 1,9 | 18 | 31 | 9,6 | 63 | 12,7 |
| | Sig. | ** | ** | ns | ns | ns | ns |

Nota: ns, (*), (**), (***) – respectivamente, não significativo ao nível de (0,05); significativo ao nível de (0,05), (0,01) e (0,001), pelo teste de F. Dimensão da amostra: n=360 (NCF, F_{int}, C_{int}); n=36 (AF); n=216 (SFE).

3.2- Expressão Vegetativa e Vigor

A redução da densidade de varas levou a um acréscimo significativo do número de netas (quadro 2), especialmente em D11, o que se veio a reflectir no vigor, com valores muito acima do considerado normal para videiras equilibradas (20g a 40g, segundo Smart & Robinson, 1991). O número de rebentos *ladrões* é particularmente superior em D23, o que se deve à forma como essa modalidade foi definida (sem qualquer espoldra nos braços). A lenha de poda tem sido largamente utilizada como um indicador de equilíbrio. Kliewer & Dokoozilian (2005), referem valores óptimos entre 0,5kg/m e 1,0kg/m para sebes monopiano. Dokoozilian & Kliewer (1995), Kliewer *et al.* (2000), com a casta Cabernet-Sauvignon na Califórnia, demonstraram ser possível produzir vinhos de alta qualidade, sem perdas na produtividade devidas a excessivo ensombramento, com valores de lenha de poda até 1,0kg/m. Em face dos resultados por nós obtidos, corroboramos a opinião dos últimos autores para o caso da Touriga-Nacional no Dão.

Em 2006 avaliou-se o tempo de poda. Em D23 foram contabilizadas 88h/ha. Esse valor decresceu 59% em D17 (36h/ha) e 67% em D11 (29h/ha). Parece, assim, evidente que, em ordem de conter custos, é obrigatório realizar a espoldra nos braços (*e.g.*, ao estado G de Baggiolini), quando a remoção dos *ladrões* é mais fácil, mais rápida e mais económica que no Inverno.

Quadro 2- Efeito da densidade de varas, desfolha e monda no vigor e expressão vegetativa. Valores obtidos em 2004, 2005 e 2006.

| Ano | Tratamento | Netas (n°/sarmento) | Ladrões (n°/cepa) | Massa 1 sarmento (g) | Lenha de Poda (kg/m) |
|------|------------|------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| 2004 | D23 | 0,7 a | na | 45 a | 1,0 |
| | D17 | 0,8 a | na | 51 a | 0,9 |
| | D11 | 3,0 b | na | 103 b | 1,2 |
| | Sig | *** | - | *** | ns |
| | F0 | 1,5 | na | 67,1 | 1,1 |
| | F1 | 1,5 | na | 65,5 | 1,0 |
| 2005 | Sig | ns | - | ns | ns |
| | D23 | 0,2 a | 7,6 c | 37 b | 0,9 |
| | D17 | 0,4 a | 2,9 b | 46 b | 0,8 |
| | D11 | 1,2 b | 0,9 a | 74 a | 0,9 |
| | Sig | *** | *** | *** | ns |
| | F0 | 0,5 | 4,0 | 53 | 0,9 |
| 2006 | F1 | 0,6 | 3,0 | 51 | 0,8 |
| | Sig | ns | ns | ns | ns |
| | M0 | 0,6 | 4,0 | 53 | 0,9 |
| | M1 | 0,6 | 3,0 | 51 | 0,9 |
| | Sig | ns | ns | ns | ns |
| | D23 | 0,4 a | 9,8 b | 40 a | 1,1 |
| 2006 | D17 | 0,8 b | 2,2 a | 57 b | 1,0 |
| | D11 | 1,8 c | 1,3 a | 93 c | 1,2 |
| | Sig | *** | *** | * | ns |
| | F0 | 1,0 | 4,5 | 66 | 1,1 |
| | F1 | 1,0 | 4,4 | 61 | 1,0 |
| | Sig | ns | ns | ns | ns |
| 2006 | M0 | 0,9 | 4,7 | 65 | 1,1 |
| | M1 | 1,0 | 4,2 | 62 | 1,1 |

3.3- Caracterização da Produção

3.3.1- Composição da uva à vindima

Pela análise dos bagos à vindima, podemos afirmar que, regra geral, não houve diferenças com relevância enológica entre qualquer das modalidades em cada ano em estudo. Em 2004, observou-se absoluta ausência de diferenças, com particular relevo para o facto de D23 e D11 apresentarem o mesmo e elevado valor de TAP, embora como iremos ver adiante, o rendimento tenha sido de 13,1t/ha em D23 e 8,5t/ha em D11. Em 2005, apesar da geral ausência de diferenças, D11 regista um valor de pH significativamente inferior e uma tendência para valores mais elevados de polifenóis totais e de intensidade corante, e mais baixo de antocianinas totais. Registe-se o bom nível do TAP em todas as modalidades. Em 2006, as diferenças estatisticamente significativas encontradas têm pouca ou nenhuma relevância enológica, contrariamente aos valores de TAP e de acidez total, globalmente mais baixos que o desejável.

Nota: ns, (*), (**), (***) – respectivamente, não significativo ao nível de (0,05); significativo ao nível de (0,05), (0,01) e (0,001), pelo teste de F. na- não avaliado. Dimensão da amostra: n=216 (todos os parâmetros).

Quadro 3- Efeito da densidade de varas, desfolha e monda na qualidade das uvas à vindima (TAP, acidez total, pH, intensidade corante [IC=A₄₂₀+A₅₂₀+A₆₂₀], antocianinas totais e índice de polifenóis totais [IPT=A₂₈₀])

| Ano | Tratamento | TAP (% V/V) | Acidez total (g ác tart/dm ³) | pH | IC | Antoci. totais _T (mg/dm ³) | IPT |
|------|------------|-------------|---|--------|------|---|-----|
| 2004 | D23 | 15,2 | 6,6 | 3,54 | na | na | na |
| | D17 | 14,9 | 6,6 | 3,57 | na | na | na |
| | D11 | 15,2 | 6,7 | 3,56 | na | na | na |
| | Sig. | ns | ns | ns | - | - | - |
| | F0 | 15,0 | 6,6 | 3,55 | na | na | na |
| | F1 | 15,2 | 6,6 | 3,57 | na | na | na |
| | Sig. | ns | ns | ns | - | - | - |
| 2005 | D23 | 13,9 | 5,7 | 3,54 b | 21,5 | 651 | 129 |
| | D17 | 14,4 | 6,0 | 3,54 b | 22,5 | 643 | 134 |
| | D11 | 14,1 | 5,9 | 3,46 a | 23,4 | 638 | 137 |
| | Sig. | ns | ns | * | ns | ns | ns |
| | F0 | 14,0 | 6,0 | 3,51 | 22,9 | 648 | 134 |
| | F1 | 14,2 | 5,8 | 3,51 | 22,0 | 640 | 132 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| | M0 | 14,0 | 5,9 | 3,52 | 22,1 | 650 | 133 |
| | M1 | 14,2 | 5,8 | 3,51 | 22,8 | 638 | 133 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | * | ns |
| 2006 | D23 | 12,0 a | 4,0 | 3,49 | 14,7 | 571 | 97 |
| | D17 | 12,6 b | 4,0 | 3,52 | 15,3 | 553 | 99 |
| | D11 | 12,1 a | 4,2 | 3,52 | 16,2 | 562 | 100 |
| | Sig. | * | ns | ns | ns | ns | ns |
| | F0 | 12,3 | 4,0 | 3,50 | 15,0 | 575 | 98 |
| | F1 | 12,2 | 4,1 | 3,52 | 15,8 | 565 | 99 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| | M0 | 12,1 | 4,2 | 3,48 | 14,9 | 576 | 98 |
| | M1 | 12,4 | 4,0 | 3,54 | 15,8 | 565 | 99 |
| Sig. | * | * | *** | ns | ns | ns | |

Podemos afirmar que a monda, a desfolha e a redução de 23 para 11 varas por metro de sebe, em qualquer dos anos em estudo, não se traduziu na melhoria da qualidade dos bagos colhidos no dia da vindima.

3.3.2- Rendimento e relações vegetação/produção

Como esperado, o número de cachos por cepa foi significativamente reduzido com a diminuição do número de varas e com a monda, não tendo a desfolha qualquer efeito nesta componente do rendimento (quadro 4). Quanto à massa média de um cacho, enquanto em 2004 e 2006 não foi afectada por qualquer dos tratamentos, em 2005 o tratamento D11 conduziu a um aumento significativo, relativamente a D23 e D17 (iguais

Nota: ns, (*), (**), (***) – respectivamente, não significativo ao nível de (0,05); significativo ao nível de (0,05), (0,01) e (0,001), pelo teste de F. na- não avaliado; A- absorvência. Dimensão da amostra: n=36.

entre si). Podemos também observar que a massa unitária do cacho aumentou de 2004 para 2006, enquanto o seu número por cepa foi semelhante em 2004 e 2005, e para valores superiores aos verificados em 2006. A conjugação destes factores levou a que os extremos quantitativos do rendimento se situassem em 2004 (inferior) e 2006 (superior). A desfolha não afectou o rendimento em qualquer dos anos em estudo.

Quadro 4- Efeito da densidade de varas, desfolha e monda nas componentes do rendimento e relações vegetação/produção

| Ano | Tratamento | Cachos/ Cepa | Massa 1 cacho (g) | Rend. (t/ha) | AF/Prod (m ² /kg) | SFE/Prod (m ² /kg) | Índice de Ravaz |
|------|------------|-----------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| 2004 | D23 | 45,3 c | 88 | 13,1 b | 2,7 | 0,8 | 4,1 |
| | D17 | 36,6 b | 93 | 11,3 b | 1,9 | 0,9 | 4,1 |
| | D11 | 28,0 a | 91 | 8,5 a | 3,1 | 1,3 | 2,5 |
| | Sig. | *** | ns | ** | ns | ns | ns |
| | F0 | 37,4 | 90 | 11,1 | 2,4 | 1,0 | 3,3 |
| | F1 | 35,8 | 92 | 10,8 | 2,7 | 0,9 | 3,8 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 2005 | D23 | 46,5 c | 103 a | 15,9 b | 1,5 | 0,8 | 4,4 |
| | D17 | 34,5 b | 107 ab | 12,3 a | 1,6 | 0,9 | 3,7 |
| | D11 | 27,8 a | 127 b | 11,7 a | 1,4 | 1,0 | 3,2 |
| | Sig. | *** | * | ** | ns | ns | ns |
| | F0 | 38,2 | 106 | 13,3 | 1,7 | 0,9 | 3,6 |
| | F1 | 34,1 | 117 | 13,3 | 1,3 | 0,8 | 3,9 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 2006 | M0 | 45,5 | 108 | 16,4 | 1,4 | 0,7 | 4,5 |
| | M1 | 26,8 | 114 | 10,2 | 1,0 | 1,1 | 3,0 |
| | Sig. | *** | ns | *** | ns | ns | ns |
| | D23 | 33,7 b | 135 | 15,2 | 2,7 | 0,8 | 3,6 |
| | D17 | 29,4 ab | 156 | 15,3 | 2,1 | 0,9 | 3,8 |
| | D11 | 25,7 a | 170 | 14,5 | 1,7 | 0,8 | 3,0 |
| | Sig. | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| 2006 | F0 | 29,3 | 160 | 15,6 | 2,2 | 0,8 | 3,4 |
| | F1 | 29,6 | 144 | 14,2 | 2,2 | 0,9 | 3,4 |
| | Sig. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| | M0 | 35,5 | 151 | 17,9 | 1,9 | 0,7 | 4,0 |
| | M1 | 23,6 | 155 | 12,2 | 2,6 | 1,0 | 2,9 |
| | Sig. | *** | ns | *** | ns | ns | ns |

A redução da densidade de varas só provocou alterações significativas no rendimento em 2004 e 2005. No primeiro ano, com D11 a apresentar rendimento significativamente inferior a D23 e D17 (iguais entre si) e em 2005 com rendimento superior em D23, relativamente a D17 e D11 (iguais entre si). Nos dois anos em que a monda foi introduzida a redução de rendimento foi altamente significativa. A redução do rendimento (38% em 2005; 32% em 2006) foi aproximadamente proporcional ao nível de

Nota: ns, (*), (**), (***) – respectivamente, não significativo ao nível de (0,05); significativo ao nível de (0,05), (0,01) e (0,001), pelo teste de F. na- não avaliado. Dimensão da amostra: n=216 (todos os parâmetros).

realização da monda ($\approx 40\%$ em 2005; $\approx 30\%$ em 2006). Também no Dão, Martins (2007), com a mesma casta, estudou a monda ao pintor a 30% e 50%. No primeiro ano do ensaio (2004) a quebra de produção foi proporcional à monda na modalidade 50% e mais que proporcional na modalidade 30%, com uma redução de 35%. No segundo ano do ensaio as quebras de produção tornaram-se menos acentuadas, por força do aumento significativo da massa dos cachos nas modalidades mondadas, o que levou à diminuição do rendimento em 22% e 35%. Como vimos, no nosso ensaio não se verificou aumento da massa dos cachos nas modalidades mondadas, o que explica a proporcionalidade na monda.

Registe-se o elevado rendimento obtido nos 3 anos do ensaio (mesmo nas modalidades mondadas) com valores entre 8,5t/ha (D11 em 2004) e 17,9t/ha (M0 em 2006). De facto, se atendermos aos estatutos da CRVDão, nomeadamente ao rendimento máximo por hectare das vinhas destinadas aos vinhos com direito à denominação de origem Dão, somente D11 em 2004 cumpre o limite estabelecido. Também os valores do título alcoométrico volúmico foram, em qualquer dos anos e para qualquer das modalidades, sempre superiores a 12,5% (V/V) (dados não mostrados), o que, segundo os estatutos da CVRDão, permitiria a todos os vinhos (mesmo os oriundos de modalidades com um rendimento superior ao dobro do permitido para vinhos DOC Dão) ostentar a menção “Nobre” ou as tradicionais designações “Garrafeira” ou “Reserva”, assim se cumprissem os outros requisitos necessários.

A relação AF/Produção (quadro 4) apresentou valores mais elevados em 2004 e 2006 o que está de acordo com a maior área foliar registada nesse anos, especialmente a contribuição das netas para a área foliar total, que com valores entre 60% e 75% provocaram o adensamento do coberto (ver quadro 1). Kliewer & Dokoozlian (2005), mostraram que em sebes com um único plano, são necessários 0,8m²/kg a 1,2m²/kg. Pelos resultados obtidos, julgamos que esse valor pode ser superior, sem que se registre um desperdício em termos de investimento da planta em folhagem, como sugerido por Williams *et al.* (1987), que colocam o limite superior em 1,7m²/kg. A razão SFE/produção apresentou valores mais uniformes ao longo dos 3 anos, variando entre 0,7m²/kg e 1,3m²/kg. Muitos autores, entre os quais Murisier & Zufferey (1997) observaram uma estabilização do teor em açúcares para valores entre 1,1m²/kg e 1,2m²/kg. Face aos nossos resultados, pensamos que os valores obtidos são adequados, excepto nas modalidades

não mondadas, em que se poderia aumentar a altura da sebe para incrementar a SFE. Smart & Robinson (1991), Kliewer & Dokoozlian (2005), entre outros, afirmam que o índice de Ravaz é um bom indicador do equilíbrio da videira. Valores abaixo de 5 indicam vigor excessivo (Smart & Robinson, 1991). No nosso ensaio os valores situaram-se entre 2,5 (D11 em 2004) e 4,5 (M0 em 2005). A generalização de considerar videiras equilibradas somente quando apresentem um índice de Ravaz entre 4 e 10, requer cuidado e cautela na sua aplicação. Pelos nossos resultados, e conjugando os valores do índice de Ravaz com a massa unitária do sarmento e restantes relações frutificação/vegetação, julgamos poder encontrar videiras equilibradas cujo resultado do índice de Ravaz se situe no intervalo de valores entre 3 e 4, indo de encontro ao que Poni *et al.* (2007) defendem, só reconhecendo como indiscutível a utilidade destes índices como indicadores de desequilíbrio severo da videira.

4- CONCLUSÕES

As condições meteorológicas de cada ciclo levaram o factor “ano” a influenciar os resultados, de tal forma que em dois anos com rendimentos semelhantes (2005 e 2006), se obtiveram bagos qualitativamente superiores no ano mais seco.

A monda conduziu a uma redução altamente significativa do rendimento, sem que tal se traduzisse em qualquer incremento qualitativo nas uvas. Se a isso associarmos os seus elevados custos, só é uma prática defensável se o objectivo for colocar o rendimento dentro dos limites impostos pelos regulamentos da CVRDão. A redução da densidade de varas e a desfolha não afectaram a composição da uva, tendo a primeira intervenção provocado o decréscimo do rendimento em dois dos anos em estudo (2004 e 2005).

Poderíamos ser então tentados a recomendar nada fazer. No entanto, conjugando os resultados do tempo de poda com o facto de que, no conjunto dos 3 anos, a modalidade D17, com $SFE/Produção=0,9m^2/kg$, $AF/Produção=1,9m^2/kg$, índice de Ravaz de 3,9 e um sarmento médio a pesar 51g (com um número de netas, que, sendo idêntico ao de D23, é significativamente inferior ao de D11), ser a modalidade mais equilibrada, julgamos que a melhor estratégia para obter um produto de qualidade e rentável, será efectuar a espoldra no tronco e braços, deixando cerca de 17 varas por metro linear de sebe, sem desfolha e sem monda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bravdo, B., Hepner, C., Loinger, C., Cohen, S. & Tabacman, H. (1984). "Effect of crop level on growth, yield and wine quality of a high yielding Carignane vineyard", *A. J. Enol. Vitic.* **35**(4):247-252.
- Dokoozilian, N.K.; Kliewer, W.M. (1995). "The light environment with grapevine Canopies. II. Influence of leaf area density on fruit zone light environment and some canopy assessment parameters". *Am. J. Enol. Vitic.*, **46** (2): 219-226.
- Duret, L. (2004). Análise sensorial da uva, Módulo de viticultura. Vinideas & ICV (Institut Coopératif du Vin, Languedoc-Roussillon). Escola Superior Agrária de Viseu.
- Kliewer, W.M. & Dokoozilian, N.K. (2005). "Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality". *Am. J. Enol. Vitic.*, **56**(3):170-181.
- Kliewer, W.M., Wolpert, J.A. & Benz, M. (2000). "Trellis and vine spacing effects on growth, canopy microclimate, yield and fruit composition of Cabernet Sauvignon". *Acta Hortic.*, **526**:21-32.
- Martins, S.A.L., (2007). Monda de cachos na casta Touriga Nacional. Efeitos no rendimento e qualidade. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia. 75pp.
- Murisier, F.; Zufferey, V. (1997). "Rapport feuille-fruit de la vigne et qualité du raisin". *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture.* 29(6):355-362.
- Poni, S., Bernizzoni, F. & Civardi, S (2007). "The issue of canopy efficiency in the grapevine: assessment and approaches for its improvement". *Acta Hortic.*, **754**:163-173.
- Rodrigues, C.A.C. (2009). Estratégias de gestão do coberto vegetal e da produção na casta Touriga-Nacional na região do Dão. Dissertação de Mestrado em Horto-fruticultura e Viticultura. Instituto Superior de Agronomia. 80pp.
- Smart, R. & Robinson, M. (1991). *Sunlight into wine. A Handbook for Winegrape Canopy Management*. Winetitles, Adelaide, 88pp.
- Williams, L. E., Biscay, P.J. & Smith, R.J. (1987). "Effect of interior canopy defoliation on berry composition and potassium distribution in Thompson Seedless grapevines". *Am. J. Enol. Vitic.* **38**(4):287-292.

PERGADO® F – À PROVA DE MÍDIO

António Dias

Responsável de Marketing – Fungicidas – Península Ibérica

Syngenta Crop Protection, Lda.

Av. República, 57 - 4º

1050-189 Lisboa

antonio.dias@syngenta.com

RESUMO

PERGADO® F é um dos membros da “família” mandipropamida, a mais recente substância activa resultante da investigação Syngenta a ser homologada em Portugal. A mandipropamida caracteriza-se por possuir uma acção específica no controlo de “míldios”, mostrando uma elevada actividade intrínseca contra este grupo de patógenos.

Pertencendo a um novo grupo químico – mandelamidas – a mandipropamida apresenta características únicas, nomeadamente no seu comportamento na planta, que lhe conferem um forte poder preventivo e uma resistência invulgar às diferentes condições atmosféricas. Esta substância activa liga-se fortemente às camadas cerosas dos tecidos e redistribui-se no interior dos mesmos, oferecendo protecção interna e externa, quer das folhas quer dos frutos.

No **PERGADO® F** a mandipropamida apresenta-se numa combinação com folpete. O produto está indicado para o controlo do míldio da videira e será, certamente, a nova referência no combate a esta importante doença no nosso país.

PERGADO® F está aconselhado em Produção / Protecção Integrada e, a mandipropamida, está registada ou em processo de registo em vários países, não havendo qualquer entrave à comercialização de produtos tratados com esta substância activa nos potenciais destinos das exportações portuguesas.

Palavras-Chave: Pergado, mandipropamida, poder preventivo, míldio da videira

8º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo – 5, 6 e 7 de Maio de 2010



INFLUÊNCIA DA DOTAÇÃO DE REGA NO TEOR DE ÁGUA DO SOLO, NO ESTADO HÍDRICO E NA PRODUTIVIDADE DE UMA VINHA DE TEMPRANILLO, NO VALE DO RIO DOURO (ESPANHA)

M^aV. ALBURQUERQUE; J. YUSTE¹

RESUMO

A variação da dotação de rega pode acarretar consequências fisiológicas e vegetais decisivas para a optimização produtiva da vinha em cada situação edafoclimática. No período entre 2005-2008 foi levado a cabo um estudo que analisa o teor de água no solo, o estado hídrico (potencial hídrico foliar) e o comportamento produtivo e vegetativo da variedade Tempranillo, através da aplicação de uma dotação de rega moderada e de outra mais reduzida numa situação edáfica concreta no vale do rio Douro. Para isto, aplicaram-se os seguintes tratamentos experimentais de rega: 20% ETo (A20) e 40% ETo (A40), desde a paragem de crescimento vegetativo até à vindima. As videiras, plantadas em 1993, estão enxertadas sobre 110R e conduzidas em cordão Royat bilateral, com uma densidade de plantação de 2,20 m x 1,15 m. Os resultados revelaram que o aumento da dotação de rega aumentou ligeiramente o teor de água no solo, melhorando o estado hídrico da planta e provocando, consequentemente, um certo aumento do desenvolvimento vegetativo e da produtividade. Assim, a redução da dotação de rega implicou uma limitação hídrica que levou a uma diminuição da produtividade global das videiras.

Palavras-chave: Evapotranspiração, potencial hídrico, rendimento, superfície foliar.

1-INTRODUÇÃO

A rega da videira continua a ser um tema controverso devido ao seu efeito na produção e na qualidade da uva. Devido ao aquecimento global, a rega converteu-se num elemento integral da produção de uva vinificável nas regiões tradicionalmente de se-

¹ Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Burgos km 119.47071 Valladolid (España).
Email: albotema@itacyl.es

queiro (Balint y Reynolds 2009). Assim, a crescente competitividade pelos escassos recursos hídricos disponíveis exige, a cada dia, um maior controlo da eficiência no uso da água (Intrigliolo et al. 2007) em lugares onde a pluviometria é insuficiente durante o ciclo vegetativo (Mullins et al. 1992), já que quando a taxa de evaporação para a atmosfera é maior que a quantidade de água presente no solo ocorre stress hídrico (Wample 2000, en Sánchez-Llorente 2004). Os efeitos do stress hídrico no desenvolvimento e na fisiologia das videiras dependerá do estado de crescimento da cepa e do ritmo a que se desenvolve o défice (Williams e Matthews 1990; Düring et al. 1996; Wample 1999; Hunter e Myburgh 2001). Além disso, um certo défice hídrico é considerado, em geral, como benéfico para produzir vinho de qualidade, principalmente vinho tinto (Keller et al. 2008). A forma mais comum de gestão da rega consiste em fazer uma estimativa das necessidades de água do cultivo e, posteriormente, comprovar que tal estimativa se adequa, mediante alguma técnica de monitorização da rega. O potencial hídrico foliar de base (Ψ_{aa}) e o de meio-dia (Ψ_{12}) são os indicadores de planta mais apropriados para decidir a rega da vinha, sendo o primeiro proporcional ao potencial matricial da parte do perfil ocupado pelo sistema radicular, que é responsável pela alimentação hídrica da videira (Albuquerque et al. 2007; Yuste et al. 2004).

O objectivo deste trabalho é estudar o efeito da dotação de rega no teor de água do solo, no estado hídrico da vinha e no desenvolvimento vegetativo e produtivo da variedade Tempranillo, a fim de encontrar uma aproximação ao equilíbrio da vinha entre a moderação na rega e os benefícios produtivos desta no vale do rio Douro.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Localização

O ensaio foi realizado em Valladolid (Espanha), no vale do rio Douro. As videiras, plantadas em 1993, são da casta Tempranillo/R110, conduzidas em cordão Royat bilateral e podadas com 10 gomos/cepa. A orientação das filas é Norte-Sul (+25° para NE-SO), com uma densidade de plantação de 2,2 m x 1,15 m. No solo em que se encontra a vinha experimental distinguem-se três horizontes, compostos por elementos grosseiros em mais de 60%. Trata-se de um solo sem limitações físicas nem químicas em profun-

didade, o que concede uma boa drenagem e uma velocidade elevada de infiltração. A maior parte do sistema radicular da vinha situa-se nos 60 cm mais superficiais do solo.

2.2-Dispositivo experimental

O ensaio foi levado a cabo entre 2005 e 2008 com dotações moderadas de rega distintas, aplicando os seguintes tratamentos experimentais: 20% ETo (A20) e 40% ETo (A40), desde a paragem de crescimento vegetativo até à vindima. O delineamento experimental foi feito em blocos de forma aleatória com 4 repetições e uma parcela principal de 11 cepas de controlo. A quantidade total de água aplicada mediante rega gota a gota em 2005, 2006, 2007 e 2008 respectivamente (entre Julho e Setembro) foi de: 77,8; 66,2; 63,5 e 78,3 mm no tratamento A20 e de 155,6; 132,5; 127,0 e 156,6 mm no tratamento A40. A temperatura média dos meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro do período 2005-2008 foi respectivamente de 19,2 °C, 21,9 °C, 20,6 °C e 17,3 °C.

2.3-Determinações Experimentais

A humidade do solo foi calculada através do teor volumétrico da humidade mediante TDR (volumetria) com um equipamento “Trase System” modelo 6050X1 (*Soil Moisture* corp. Califórnia, EUA). As medições de humidade do solo foram realizadas deixando um dia de intervalo após a rega semanal. O estado hídrico da vinha foi estimado através do potencial hídrico foliar de base, utilizando uma câmara de tipo Scholander. O desenvolvimento vegetativo foi determinado através do peso da madeira de poda, mediante contagem e peso individual dos sarmentos de cada cepa. O rendimento da uva foi determinado no momento da vindima através da contagem e do peso dos cachos de cada videira. A superfície foliar total (LAI) foi medida em Agosto, por volta da época de maturação dos frutos, através da regressão linear entre a superfície e a longitude do nervo central da folha, calculando a superfície foliar do pânpano médio a partir da medida de 4 pânpanos por cepa e multiplicando pelo número total de pânpanos de cada cepa, usando uma cepa de controlo por repetição.

3-RESULTADOS

3.1-Teor de água no solo

Em 2005, o teor de água do solo nos tratamentos aplicados mostrou uma percentagem próxima dos 15% (v/v) no início do ciclo vegetativo, mas na época de maior procura hídrica (de Junho a Setembro) este teor diminuiu até atingir valores abaixo dos 10% (v/v) (figura 1). A limitação de disponibilidade hídrica foi maior em 2005 do que nos anos anteriores, que tiveram mais precipitação, devido à escassa pluviometria desde o início do ano, com recarga mínima do perfil durante o inverno anterior. As diferenças numéricas observadas a favor do tratamento A40 não resultaram estatisticamente significativas. Em 2006, as diferenças entre tratamentos foram menos vincadas do que ao longo do ano anterior, não sendo em nenhum caso estatisticamente significativas.

A pluviometria desde Janeiro até ao início do ciclo vegetativo fez com que o teor de água se situasse entre os 15% e os 20% (v/v). No entanto, entre Junho e Setembro desceu abaixo dos 10%. Em 2007, o teor de água permaneceu entre os 17 e os 20% no primeiro semestre, superando o teor dos dois anos anteriores. Contudo, a partir de Junho desceu até aos 13% (v/v) até Setembro, com maior teor em A40 do que em A20. As maiores diferenças numéricas entre A40 e A20 (aproximadamente 3% a favor do A40) foram notadas entre finais de Julho e finais de Agosto, sem que chegassem a ser estatisticamente significativas. Em 2008, o teor de água situou-se entre os 18 e os 22% (v/v) de Janeiro até Junho. A partir de Julho, quando a procura hídrica foi maior, o teor de água diminuiu até se situar entre os 10 e os 15% (v/v), coincidindo com um período sem precipitação. A diferença favorável a A40 foi máxima em meados de Agosto, cerca de 4% (v/v), ainda que não tenha sido estatisticamente significativa.

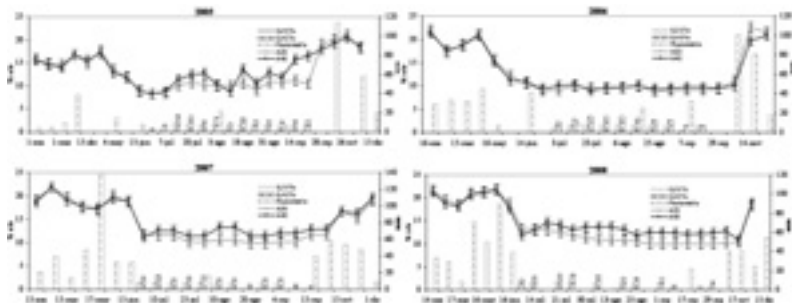


Figura 1. Teor de água (% v/v) no solo (60 cm), pluviometria (mm) e rega aplicada (mm) para os tratamentos A20 e A40, em 2005, 2006, 2007 e 2008. Diferenças sem significância estatística em nenhuma das datas de medição.

3.2-Potencial hídrico foliar

Medido antes do amanhecer, o potencial hídrico foliar reflectiu uma tendência, durante o verão, similar nos 4 anos de estudo, obtendo o tratamento A40, em geral, valores menos negativos que o A20, o que reflecte um menor stress hídrico das videiras mais regadas. Em 2005, as diferenças foram estatisticamente significativas em Agosto e Setembro. As videiras do tratamento A40 mantiveram valores bastante estáveis ao longo do ciclo, claramente menos negativos que os do tratamento A20 (figura 2).

Em 2006, a tendência foi muito similar à de 2005, apresentando o tratamento A40 valores superiores ao tratamento A20, distanciando-se progressivamente a partir de Julho até à sua maior diferença, estatisticamente significativa, em Setembro (-0,39 MPa para A40 e -0,68 MPa para A20). Em 2007, os valores de potencial hídrico foliar de A40 mantiveram-se apenas ligeiramente acima dos do tratamento A20, de Julho a Setembro, aproximando-se bastante dos valores de ambos os tratamentos, mantendo-se a mesma tendência durante todo o verão e sem que as diferenças fossem estatisticamente significativas.

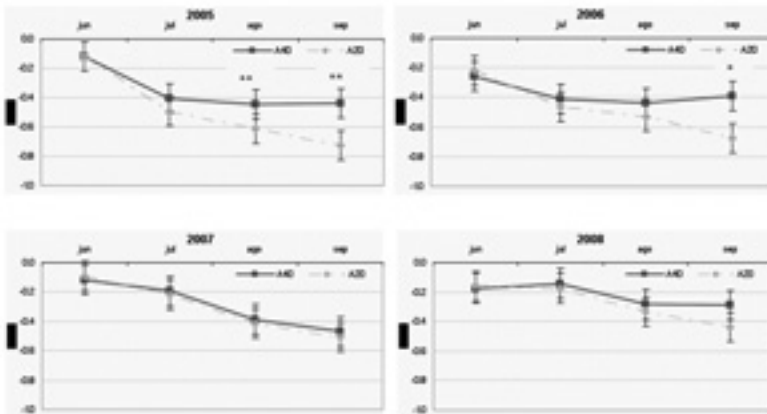


Figura 2. Potencial hídrico foliar (MPa) antes do amanhecer para os tratamentos A20 e A40, em 2005, 2006, 2007 e 2008. Significância estatística: - (não significativo), * ($p < 0.05$), ** ($P < 0.01$).

Em 2008, os valores de A40 também se mantiveram acima dos de A20 em todas as medições realizadas, mas a diferença entre ambos os tratamentos foi maior a partir de Agosto, sobretudo em Setembro, mostrando uma tendência similar à de 2005 e 2006, sem que as diferenças fossem estatisticamente significativas.

Resumidamente, o tratamento com maior consumo de água mantém-se, ao longo do verão, com valores de potencial hídrico foliar superiores aos do tratamento menos irrigado, o que favorece uma situação de menor stress hídrico, que poderia classificar-se como moderado.

3.3-Superfície foliar total

A aplicação de diferentes dotações de rega provocou algumas diferenças na superfície foliar (LAI) desenvolvida pelas estirpes/videiras que não chegaram a ser estatisticamente significativas (tabela 1). No geral, a superfície foliar total de A40 foi quantitativamente maior que a de A20. As diferenças observadas, sempre favoráveis a A40, foram escassas em 2005, 2007 e 2008, e mais notáveis em 2006. Assim, em 2006, o tratamento A40 superou em $0,55 \text{ m}^2/\text{m}^2$ a superfície foliar de A20. As diferenças favoráveis a A40 observadas em 2006 e 2007 deveram-se fundamentalmente ao maior contributo foliar de netas, que representou em 2006 43% em A20 e 55% em A40 da superfície foliar total, enquanto em 2007 a superfície foliar de netas aumentou para 51% em A20 e 56% em A40 a superfície foliar total. Apesar de tudo, as diferenças numéricas encontradas entre os tratamentos na superfície foliar de netas não foram estatisticamente significativas. Em 2008, a superfície foliar total de A40 superou a de A20 em $0,19 \text{ m}^2/\text{m}^2$, devido à contribuição do pântano principal, sem diferenças estatisticamente significativas. Definitivamente, a aplicação de uma dotação de rega superior provocou uma certa tendência para o aumento da superfície foliar, geralmente mais em relação às netas do que ao pântano principal.

Tabela 1. Superfície foliar (LAI) total do pântano principal e das netas(m²/m²) em 2005, 2006, 2007 e 2008, para os tratamentos A20 e A40. Nível de significância estatística (N.S.): - = não significativo; * = p < 5%; ** = p < 1%.

| Ano | Tratamento | LAI total | LAI ppal. | LAI netas |
|------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 2005 | A20 | 2,56 | 1,44 | 1,13 |
| | A40 | 2,67 | 1,50 | 1,17 |
| | N.S. | - | - | - |
| 2006 | A20 | 1,93 | 1,09 | 0,84 |
| | A40 | 2,48 | 1,12 | 1,36 |
| | N.S. | - | - | - |
| 2007 | A20 | 3,44 | 1,68 | 1,76 |
| | A40 | 3,57 | 1,57 | 2,00 |
| | N.S. | - | - | - |
| 2008 | A20 | 3,01 | 1,73 | 1,27 |
| | A40 | 3,20 | 1,96 | 1,23 |
| | N.S. | - | - | - |

3.5 - Desenvolvimento vegetativo e produtivo

As quantidades de rega aplicadas provocaram diferenças no desenvolvimento vegetativo das videiras, expressado através da madeira de poda, favorecendo o tratamento A40, embora apenas tenham sido estatisticamente significativos em 2005. Assim, a madeira de poda do tratamento A40 foi maior que a de A20 em quatro anos de estudo, com um aumento médio de 18,5%. Particularmente em 2005 e 2006, o A40 produziu 20,9% e 25,4% mais madeira de poda do que o A20. O aumento da dotação de rega provocou maiores aumentos no rendimento em 2005 e 2006 do que em 2007 e 2008 (tabela 2). Nomeadamente em 2005 e 2006, o rendimento alcançado pelo A40 superou aproximadamente em 3 t/ha o de A20, enquanto em 2007, quando o rendimento diminuiu consideravelmente relativamente aos anos anteriores, os valores foram apenas de 5,2 t/ha no A20 e 6,6 t/ha no A40, devido aos problemas patológicos extraordinários que se produziram ao longo do ciclo (míldio, botrytis, etc.). Em 2008, o rendimento de A40 foi de apenas mais 1,2 t/ha do que o A20. Em suma, o aumento médio de A40 relativamente ao A20 foi de 26,1%, com 31,2%, 33,6%, 26,9% e 12,9% em 2005, 2006, 2007 e 2008 respectivamente, embora as diferenças não tenham resultado estatisticamente significativas em nenhum ano de estudo. A diferença de rendimento favorável ao A40 relativa-

mente ao A20 deveu-se, sobretudo, ao peso do cacho, ainda que o número de cachos tenha parcialmente ajudado, sobretudo em 2006.

Tabela 2. Madeira de poda (t/ha), rendimento (t/ha), número de cachos por videira, peso do cacho (g), peso do bago (g) para os tratamentos A20 e A40, em 2005, 2006, 2007 e 2008. Nível de significância estatística (N.S.): - = não significativo; * = $p < 5\%$; ** = $p < 1\%$.

| Ano | Tratamento | Madeira de poda | Rendimento | Nº Cachos | Peso Cacho | Peso Bago |
|------|------------|-----------------|------------|-----------|------------|-----------|
| 2005 | A20 | 3,02 | 7,7 | 14,3 | 135 | 1,27 |
| | A40 | 3,65 | 10,1 | 14,9 | 167 | 1,37 |
| | N.S. | * | - | - | * | - |
| 2006 | A20 | 2,60 | 11,0 | 15,0 | 187 | 1,77 |
| | A40 | 3,26 | 14,7 | 16,5 | 222 | 1,82 |
| | N.S. | - | - | - | - | - |
| 2007 | A20 | 4,50 | 5,2 | 11,5 | 113 | 2,18 |
| | A40 | 5,02 | 6,6 | 11,3 | 147 | 2,21 |
| | N.S. | - | - | - | * | - |
| 2008 | A20 | 4,94 | 9,3 | 14,5 | 159 | 1,90 |
| | A40 | 5,73 | 10,5 | 15,2 | 176 | 1,97 |
| | N.S. | - | - | - | - | - |

O peso do cacho, em média 20,8% maior no A40 do que no A20, mostrou diferenças estatisticamente significativas em 2005 e 2007, embora não o tenha feito em 2006 ou 2008. O peso do bago mostrou a mesma tendência que o rendimento, ou seja, o tamanho do bago de A40 foi maior que os de A20 nos 4 anos, ainda que as diferenças não tenham resultado estatisticamente significativas. Em suma, o aumento da dotação de rega pressupôs um aumento médio do rendimento de 26,2% através dos seus diversos componentes em geral.

CONCLUSÕES

Um consumo de água moderado mantém as videiras, ao longo do verão, numa situação de menor stress do que quando o consumo de água é reduzido para metade, com valores de potencial hídrico foliar superiores, relacionados com o teor de água do solo em cada tratamento. Para além disso, a aplicação de uma maior dotação de rega, no tratamento A40, favoreceu o desenvolvimento foliar relativamente ao tratamento A20 e propiciou um maior desenvolvimento vegetal e frutífero. Definitivamente, as videiras mais regadas foram beneficiadas fisiologicamente numa situação de stress moderado, embora à vista da distinta intensidade dos efeitos anuais se deva considerar que a gestão da rega deve ser levada a cabo em função das condições climáticas anuais.

BIBLIOGRAFIA

- ALBURQUERQUE M^ºV., YUSTE R., RUBIO J.A., YUSTE J. (2007). Evolución del agua en el suelo y del potencial hídrico como condicionantes climáticos del cv. Tempranillo, expresados a través del régimen hídrico y de la densidad de plantación. *Viticultura/Enología profesional* nº 112: 26-35.
- BALINT G., REYNOLDS A. (2009). Effect of different irrigation strategies on vine physiology and grape quality at Cabernet Sauvignon and Sauvignon blanc in a cool climate area. *16 th International GiESCO Symposium*, 12-15 Julio, 2009. Universidad de California, Davis (CA, USA).
- DÜRING H., LOVEYS B.B., DRY P.R. (1996). Root signals affect water use efficiency and shoot growth. Pro. Workshop Strategies to Optimize Wine Grape Quality. *Acta Horticulturae* nº 427: 1-13.
- HUNTER J.J., MYBURGH P.A. (2001). Bases ecophysiológicas para la gestión de l'eau des vignes en Afrique du Sud, avec particulière aux limites de l'environnement (suite). *Progrès Agricole et Viticole* nº 118 (24): 527-537.
- INTRIGLIOLO D., FERRER P., CASTEL J.R. (2007). Monitorización del riego en vid. En: *Fundamentos, aplicación y consecuencias del Riego en la vid*. Ed. Editorial Agrícola Española S.A., Madrid (España), p. 85-113.

- KELLER M., SMITHYMAN R., MILLS L. (2008). Interactive effects of deficit irrigation and crop load on Cabernet Sauvignon in an arid climate. *Am. J. Enol. Vitic.* 59:221-234.
- MULLINS M.G., BOUQUET A., WILLIAMS E. (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press. 239 pp.
- SÁNCHEZ-LLORENTE P. (2004). Respuestas de la vid (*Vitis vinifera* L., cv. Tempranillo) en relación a la evolución del contenido de agua en el suelo en regímenes hídricos deficitarios. *Tesis doctoral*. Departamento de producción vegetal: Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid. España. 228 pp.
- WAMPLE R. (1999). Irrigation management for high quality wine grape production: considerations for west Oregon. *Proc. Oregon Horticultural society*, nº 90: 139-148.
- WILLIAMS L.E., MATHEWS M.A. (1990). Grapevine. In: *Irrigation of agricultural crops*. Ed. B.A. Steward y D.R. Nielsen, vol. XXX. Madison (EE. UU.), p. 1019-1055.
- YUSTE J., GUTIERREZ I., RUBIO J.A., ALBURQUERQUE M^aV. (2004). Réponse des potentiels hydriques de la feuille et du xylème comme indicateurs de l'état hydrique de la vigne, cépage Tempranillo, soumis à différents régimes hydriques dans la vallée du Duero. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* nº 38 (1): 21-26.

VITICULTURA EM FORTE DECLIVE E CONDUÇÃO DE VIDEIRAS EM PATAMARES ESTREITOS NA REGIÃO DO DOURO – 4 ANOS DE RESULTADOS

Jorge QUEIROZ^{1,2}; Mário CUNHA^{1,3}; António FONSECA¹; Mafalda MACHADO¹; Luísa BORGES⁴; Rogério de CASTRO⁴; Mário de SOUSA⁵; António MAGALHÃES⁶; David GUIMARAENS⁶

RESUMO

A instalação da vinha em encostas de elevado declive apresenta especificidades que motivaram estudos em diversos países e regiões. A recente classificação da Região do Alto Douro Vinhateiro como Património Mundial da Humanidade pela UNESCO veio reforçar a importância da sistematização em patamares estreitos como solução quer para encostas de acentuado declive, quer para a reestruturação das vinhas tradicionais, com manutenção dos tradicionais muros de pedra de xisto. Os resultados apresentados para os anos 2006 a 2009, referem-se a um ensaio instalado em 2002 na Quinta de Santo António - The Fladgate Partnership Vinhos SA - Douro, numa encosta sistematizada em patamares estreitos, com 2,3 m de largura e uma linha de plantação, com a casta Touriga Nacional enxertada em 110R. Estudaram-se duas alternativas de condução (Monoplano Vertical Ascendente (VSP) e Cordão Duplo (LYS 2/3) com uma sebe ascendente e outra retombante) e duas distâncias de plantação na linha (0,80m e 1,20m) num delineamento experimental do tipo Split-Split-Plot. Os resultados obtidos evidenciaram um aumento de produção de 42% no cordão duplo LYS 2/3, relativamente ao VSP e de 30% na distância de plantação 0,80 m em relação à distância 1,20 m sem que tenha havido alterações a nível dos parâmetros da qualidade.

Palavras-chave: Douro, Vinho do Porto, Viticultura de Montanha, Sistemas de Condução, Distâncias de plantação.

¹ Faculdade de Ciências, Universidade do Porto – Engenharia Agronómica, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, E-mail: jqueiroz@fc.up.pt

² GRESA, Laboratório Associado REQUIMTE, Universidade do Porto.

³ Centro de Investigação em Ciências Geo-espaciais, Universidade do Porto.

⁴ Instituto Superior de Agronomia – U. T. L. -Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa

⁵ DRAPNorte, Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro, 5050-071 Peso da Régua

⁶ The Fladgate Partnership Vinhos, S. A., R. Barão de Forrester, 404, 4400 V.N. Gaia

1 – INTRODUÇÃO

Em viticultura de montanha, de forte declive, a instalação da vinha levanta dificuldades acrescidas.

Na Região do Douro os trabalhos efectuados ao longo de séculos por várias gerações traduziram-se na notável obra que a UNESCO veio a reconhecer como Património Mundial em 14 de Dezembro de 2001. Tendo os sistemas de implantação da vinha evoluído ao longo dos séculos, são de referir pela sua importância histórica e paisagística os geios pré-filoxéricos e os socalcos pós-filoxéricos, que ainda hoje representam cerca de 50% da área de vinha da Região (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A necessidade de mecanização e de simplificação das tarefas vitícolas mais penosas vieram introduzir nos anos 80 do Séc. XX as vinhas em patamares largos (com duas linhas de plantação) e as vinhas plantadas segundo o maior declive (“ao alto”). Em alternativa aos patamares largos surgem, de seguida, os patamares estreitos, com uma largura de plataforma inferior a 2,5 m e uma só linha de plantação, obrigatórios segundo a legislação abrangendo o Alto Douro Vinhateiro – Património Mundial, em declives entre os 30 e os 50%. Os cerca de 30 anos de experiência com estes diferentes sistemas de implantação da vinha permitiram já uma reflexão fundamentada e a consolidação do conhecimento acerca das vantagens e inconvenientes de cada um QUEIROZ *et al.*, (2009), do seu modo de execução, assim como de avanços tecnológicos sobre a forma de construção de patamares estreitos. A este respeito destacam-se os trabalhos de MAGALHÃES (2002) e GUIMARAENS e MAGALHÃES (2006), que consideram vital a assistência do sistema laser na sua construção, de modo a assegurar o rigor no seu declive longitudinal (3%).

As especificidades dos sistemas de instalação da vinha e da condução da videira, em encostas de elevado declive motivou estudos como os realizados na Suíça por KOBLET e FAUST (1994) e MURISIER *et al.* (1995), na Itália por CARGNELLO (1995), em Portugal na Região do Douro por FÉLIX (1985) e na Região dos Vinhos Verdes por CASTRO *et al.* (1998) tendo sido alvo de estudos no âmbito do Projecto Agro 739 – Condução de Videiras em Patamares Estreitos (de 1 linha) na Região do Douro, cujos resultados de progresso foram sendo publicados ao longo dos últimos anos (QUEIROZ, *et al.*, 2008a, QUEIROZ, *et al.*, 2008b, QUEIROZ, *et al.*, 2009).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio decorreu entre 2006 e 2008, na Quinta de Santo António, pertença da *The Fladgate Partnership Vinhos, S.A.*, Freguesia de Vale de Mendiz, Alijó, Douro (Cima Corgo - Latitude de 41° 14' Norte, Longitude de 7° 31' Oeste, altitude média de 275 metros), com um clima segundo a classificação de Thornthwaite do tipo C₁B'3sb'4, e valores médios de 658 mm de precipitação e 16,2°C de temperatura, (período 1931-1960, Posto Meteorológico do Pinhão, FERREIRA, 1965). A vinha foi implantada em 2002, numa encosta com declive inicial de 45-50%, sistematizada em patamares estreitos de 1 bardo, com 2,3 m de largura, apresentando-se neste trabalho os resultados obtidos com a casta Touriga Nacional, das castas mais nobres em cultura no Douro, enxertada em 110R.

O delineamento experimental foi do tipo split-plot-plot, com 4 blocos, e os tratamentos divididos em dois níveis: Sistema de condução (nível principal) e a Distância de plantação entre videiras na linha (nível secundário), num total de 16 unidades experimentais. As modalidades em estudo consistiram em: Nível I - dois Sistemas de Condução: i) o tradicional monoplano vertical ascendente, podado em cordão Royat (*Vertical Shoot Positioning* - VSP na terminologia anglo-saxónica), representando o controlo e ii) um cordão duplo com parte da sebe orientada de forma ascendente, em tudo semelhante ao VSP, e outra parte orientada de forma retombante o LYS 2/3, adaptação à encosta do LYS (CASTRO *et al.*, 1998) (Imagens dos sistemas de condução em QUEIROZ *et al.*, 2009) e Nível II – duas distâncias entre videiras na linha (0,80m e 1,20 m), (dados disponíveis a partir de 2007). Os resultados foram recolhidos, sempre que possível, em 20 videiras por unidade experimental. De modo a permitir a comparação dos resultados, quando adequado expressaram-se os valores por metro linear.

Para além dos dados agronómicos (parâmetros do rendimento e da qualidade), foram recolhidos dados acerca da área foliar (determinada de acordo com a metodologia proposta por LOPES e PINTO, 2005), potencial hídrico foliar e trocas gasosas a nível dos estomas.

Os resultados da comparação das médias, através da ANOVA foram expressas através do nível de significância.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento acumulado ao longo dos quatro anos de ensaio foi 42% superior no cordão duplo LYS 2/3 relativamente ao tradicional monoploano vertical ascendente VSP, com valores de 2,60 e 1,55 kg por metro linear em 2006, 6,06 e 4,92 kg em 2007, 2,78 e 1,84 kg em 2008 e 1,81 e 1,04 kg em 2009 (Figura 1).

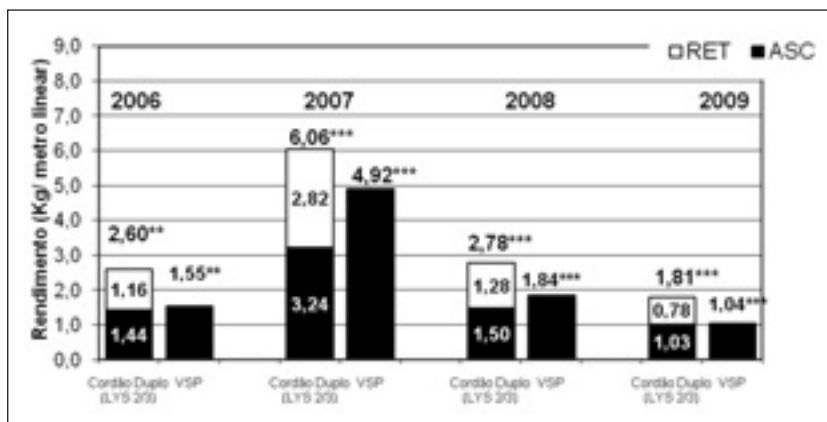


Figura 1 – Efeito do sistema de condução cordão duplo (LYS 2/3) e monoploano vertical ascendente (VSP) no rendimento (kg / metro linear). Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

O maior rendimento do cordão duplo LYS 2/3 resultou de um número de cachos por metro linear significativamente superior (Tabela 1), motivado por uma maior carga à poda (dados não apresentados) devido à divisão em duas sebes. O peso do cacho (Tabela 1) apresentou valores mais elevados no sistema tradicional VSP, em três dos quatro anos, ainda que com significância estatística apenas em 2007 e 2009. Já que no se refere ao peso do bago apresentados na mesma tabela 1, não se verificou uma tendência definida ao longo dos quatro anos nos valores encontrados, que variaram de ano para ano.

Tabela 1 – Efeito do sistema de condução no número de cachos por metro linear, peso do cacho (kg) e peso do bago (g). Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Nº cachos/metro linear | | | | Peso do cacho (kg) | | | | Peso do bago (g) | | | |
|-----------------------------|-------------|------------------------|------|------|------|--------------------|-------|-------|-------|------------------|------|------|------|
| | | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Sistema de Condução Sig (f) | VSP | 9,9 | 21,4 | 17,4 | 10,4 | 0,161 | 0,233 | 0,104 | 0,114 | 1,28 | 1,74 | 1,01 | 1,76 |
| | LYS 2/3 | 18,8 | 29,8 | 26,6 | 19,1 | 0,139 | 0,204 | 0,108 | 0,096 | 1,24 | 1,53 | 0,97 | 1,92 |
| | | *** | *** | *** | *** | n.s. | *** | n.s. | * | n.s. | ** | n.s. | aj |

No que se refere aos parâmetros da qualidade (Tabela 2), os valores do álcool provável foram satisfatórios ao longo dos quatro anos, apresentando em 2006 valores de 15,5% vol. no VSP e 13,7% vol. no cordão duplo LYS 2/3, um valor ainda assim elevado, devido à ocorrência de uma produção excessiva nesse ano neste sistema de condução. Nos restantes anos os valores da produção foram semelhantes nos dois sistemas de condução, sendo relativamente mais baixos no ano de 2007 devido à chuva ocorrida na semana da vindima, pois no controlo de maturação realizado na semana anterior os valores encontrados foram superiores aos 13% vol. Quanto aos restantes parâmetros da qualidade apresentados, acidez total e pH, não se verificaram diferenças entre os dois sistemas de condução.

Tabela 2 – Efeito do sistema de condução no álcool provável (% vol.), acidez total (gr. de ác. Tart/l) e pH. Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Álcool provável (% vol.) | | | | Acidez Total (gr. de Ac. Tart/l) | | | | pH | | | |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|------|------|------|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Sistema de Condução Sig (f) | VSP | 15,5 | 12,4 | 14,0 | 14,2 | 4,03 | 4,49 | 4,28 | 4,62 | 3,91 | 3,50 | 3,46 | 3,59 |
| | LYS 2/3 | 13,7 | 12,4 | 13,8 | 14,5 | 3,72 | 4,22 | 4,24 | 5,03 | 3,84 | 3,53 | 3,46 | 3,60 |
| | | *** | n.s. | n.s. | aj | n.s. | n.s. | n.s. | aj | n.s. | n.s. | n.s. | aj |

Nota (Tab. 1): a) dados não analisados estatisticamente. Significância do Teste F: n.s – não significativo, ** = significativo ao nível de 0,01; *** = significativo ao nível 0,001.

Nota: (Tab. 2): a) dados não analisados estatisticamente. Significância do Teste F: n.s – não significativo, *** = significativo ao nível 0,001.

De referir que os resultados encontrados ao longo destes quatro anos são concordes com os referidos por MURISIER *et al.* (2001), que do mesmo modo referem aumentos de rendimento, com manutenção da qualidade, em modalidades conduzidas em cordão duplo, um ascendente e outro retombante, implantadas em patamares estreitos.

No que se refere ao efeito da distância de plantação, único factor de que o viticultor dispõe para poder actuar sobre o número de plantas por hectare em vinhas implantadas em patamares estreitos, verificou-se nos dados referentes aos anos de 2007 a 2009, um aumento de produção de 30% na distância de plantação 0,80 m em relação à distância 1,20 m com valores que foram significativamente superiores ao longo dos três anos do ensaio (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da distância de plantação na linha no rendimento (kg/metro linear), número de cachos por metro linear, peso do cacho (kg). Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Rendimento (kg/metro linear) | | | Nº cachos / metro linear | | | Peso do cacho (kg) | | |
|--------------------|-------------|------------------------------|------|------|--------------------------|------|------|--------------------|-------|-------|
| | | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Distância na linha | 1,20m | 4,78 | 1,96 | 1,31 | 23,3 | 15,6 | 13,9 | 0,233 | 0,096 | 0,104 |
| | 0,80m | 5,97 | 2,67 | 1,79 | 26,3 | 19,4 | 18,6 | 0,203 | 0,117 | 0,101 |
| Sig (f) | | *** | *** | ** | ** | *** | *** | *** | ** | n.s. |

Este resultado, que consideramos da maior importância, pode minorar as desconfiças dos viticultores em relação a este modo de implantação da vinha, muitas vezes referido como tendo produções inferiores aos patamares largos (QUEIROZ *et al.*, 2009), sistema de implantação inaceitável na Viticultura actual, que se pretende sustentável (MAGALHÃES e GUIMARAENS, 2009). Também neste caso a maior produção advém de um maior número de cachos por metro linear, já que quanto ao peso do cacho os resultados encontrados ao longo dos três anos não apresentam uma tendência definida (Tabela 3).

¹ Significância do Teste F: n.s – não significativo, ** = significativo ao nível de 0,01; *** = significativo ao nível 0,001.

Quanto aos parâmetros qualitativos a distância de plantação 0,80 m apresentou valores superiores de álcool provável (Tabela 4), com significância do ponto de vista estatístico em 2007, não existindo diferenças significativas entre modalidades nos restantes dois anos (Tabela 4). No que se refere aos valores da acidez total e pH, apenas em 2007 existiram diferenças a nível deste último parâmetro, em que a uvas mais maduras correspondeu um pH mais elevado.

Tabela 4 – Efeito da distância de plantação na linha no álcool provável (% vol.), acidez total (gr. de ác. Tart/l) e pH. Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Álcool Provável (%vol) | | | Acidez Total (g de Ác. Tar/l) | | | pH | | |
|--------------------|-------------|------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Distância na linha | 1,20m | 11,9 | 13,7 | 14,2 | 4,38 | 4,15 | 4,78 | 3,48 | 3,48 | 3,57 |
| | 0,80m | 12,9 | 14,0 | 14,4 | 4,20 | 4,34 | 4,73 | 3,56 | 3,47 | 3,47 |
| Sig (f) | | * | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | * | n.s. | n.s. |

Localizando-se o ensaio no Cima Corgo, caracterizado por uma baixa precipitação, numa vinha não regada, a sustentabilidade a prazo do sistema poderá ser comprovada através da evolução do peso da lenha da poda.

No que se refere ao vigor, avaliado através do peso da lenha da poda, e para o qual se apresentam os resultados dos três últimos anos, verifica-se não ter existido diferenças entre o sistema de condução cordão duplo (LYS 2/3) e o tradicional VSP (Tabela 5). Já no que se refere ao peso da vara verificam-se valores significativamente mais baixos no cordão duplo (LYS 2/3), do que no VSP. Estes valores situam-se, no entanto, ou no intervalo ou ligeiramente acima dos considerados óptimos por SMART & ROBINSON (1991).

¹ Significância do Teste F: n.s – não significativo, * = significativo ao nível de 0,05.

Tabela 5 – Efeito do sistema de condução no peso da lenha da poda (kg/metro linear) e peso da vara (kg).
Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Peso lenha poda (kg/metro linear) | | | Peso da vara (kg) | | |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
| | | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Sistema de Condução | VSP | 0,893 | 0,785 | 0,646 | 0,088 | 0,060 | 0,065 |
| | LYS | 0,970 | 0,766 | 0,654 | 0,056 | 0,037 | 0,042 |
| Sig (f) | | a) | n.s. | n.s. | a) | *** | *** |

No que se refere ao efeito da distância de plantação (Tabela 6) verifica-se um maior peso da lenha da poda nas modalidades plantadas a 0,80 m, significativamente superior ao da distância 1,20m.

Tabela 5 – Efeito da distância de plantação na lenha no peso da lenha da poda (kg/metro linear) e peso da vara (kg). Touriga Nacional, Quinta de Santo António, 2006 - 2009.

| Factores | Modalidades | Peso lenha poda (kg/metro linear) | | | Peso da vara (kg) | | |
|-----------------------|-------------|--------------------------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
| | | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Distância na linha | 1,20m | 0,550 | 0,566 | 0,547 | 0,053 | 0,045 | 0,052 |
| | 0,80m | 0,976 | 0,997 | 0,749 | 0,083 | 0,055 | 0,048 |
| Sig(f) | | a) | *** | *** | a) | *** | n.s. |

No que se refere ao peso da vara os valores foram superiores na modalidade 0,80m nos anos de 2007 e 2008 (neste ano com significância estatística), sendo semelhantes em 2009. Verifica-se deste modo a existência de uma tendência para um maior vigor na modalidade 0,80m quando comparada com a modalidade 1,20m.

Os valores mais elevados de produção verificados no cordão duplo (LYS 2/3) e na distância 0,80m sem que se tenham verificado alterações significativas de qualidade (excepção ao ano de 2006 com sobreprodução no Cordão duplo) dever-se-ão à manutenção da relação Superfície Foliar Exposta (SFE) / peso das uvas, graças ao maior valor desta superfície nestas duas modalidades, quando comparadas com o VSP e a distância

¹ Significância do Teste F: n.s – não significativo, *** = significativo ao nível 0,001. a) dados não analisados estatisticamente.

1,20m (na figura 2 apresentam-se os valores referentes ao ano de 2008, com padrão semelhante ao verificado nos anos anteriores. Os dados de 2009 não são apresentados devido a perturbações associadas ao fenómeno denominado Crescimento Restrito na Primavera referido por MAGALHÃES, 2010).

No que se refere aos parâmetros ecofisiológicos os resultados obtidos ao longo do estudo não mostraram diferenças com significado agronómico, apesar da existência de diferenças significativas a nível de áreas foliares, podendo os valores do potencial de base (dados referentes ao ano de 2007 na figura 3) ser considerados moderados e adequados à produção de uvas de qualidade.

Quanto à taxa de fotossíntese ao longo dos anos em estudo, ligeiras diferenças entre modalidades não foram relevantes do ponto de vista agronómico, pelo que devido à falta de espaço não são apresentados resultados.

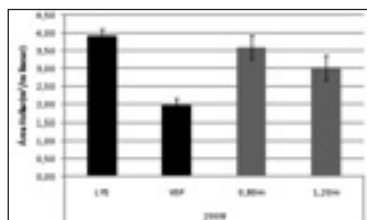


Figura 2 – Efeito do sistema de condução e da distância de plantação na área foliar (m² / metro linear).

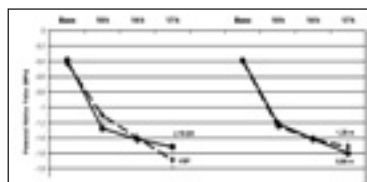


Figura 3 – Efeito do sistema de condução e da distância de plantação no potencial hídrico foliar MPa

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos ao longo dos quatro anos permitiram concluir que em termos de rendimento o cordão duplo LYS 2/3 é um sistema de condução com maior potencial de rendimento do que o tradicional monopiano vertical ascendente VSP (42% superior na média dos 4 anos) o que o pode tornar interessante para patamares estreitos. No entanto dadas as especificidades edafo-climáticas do Douro, os resultados, mesmo sendo de quatro anos deverão ser encarados com precaução e confirmados ao longo dos próximos anos.

No que se refere à distância de plantação na linha, a consistência dos resultados registados permitiram concluir que a distância 0,80m apresenta melhores resultados a nível de rendimento (mais 30% nos três anos estudados) e vigor, do que a distância 1,20m, eventualmente com ligeiros ganhos de qualidade ou pelo menos a sua manuten-

ção, graças a uma relação folhas/frutos equilibrada. Consequentemente esta será uma distância de plantação que numa viticultura de encosta, sistematizada em patamares estreitos e não regada traz vantagens competitivas, para além de permitir o cumprimento da legislação prevista em termos de densidades de plantação, para o Douro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- CARGNELLO, G. (1995). Recherches sur le modélisme pour une production viti-vinicole globalement intégrée dans des terrains à fortes et très fortes pentes. 8^{es} Jornadas GESCO, Vairão, Portugal, 344-350.
- CASTRO, R., MOTA, T., GARRIDO, J. e CAMPELO, J. (1998). Alternatives de conduite pour les vignes en forte pente dans la région des “Vinhos Verdes”. 10^{èmes} Journées GESCO, Chagnins, 224 - 227.
- FÉLIX, R. (1985). Restructuration du vignoble en pente du Douro. Bull. de l’OIV. 656/7.
- GUIMARAENS, D. and MAGALHÃES, A. (2006). Soil erosion protection using three different planting models on the slopes of the Douro Valley. Primo Congresso Internazionale Sulla Viticoltura di Montagna e in Forte Pendenza, CERVIM, Saint-Vicent (Vallée d’Aoste).
- KOBLET, W. & FAUST, H. (1994). Culture de la vigne en petites terrasses. 7^{èmes} Journées GESCO, Valladolid, 286-289.
- LOPES, C. and PINTO, P. (2005). Easy and accurate estimation of grapevine leaf area with simple mathematical models, VITIS 44 (2), 55-61.
- MAGALHÃES, A. (2002). A construção de patamares de uma linha em encostas com mais de 40% de declive. Boletim Informativo da CIRDD. II Trimestre, nº10, Régua.
- MAGALHÃES, A. (2010). Comunicação pessoal.
- MAGALHÃES, A e GUIMARAENS, D. (2009). Um Novo Modelo de Vinha na Região do Douro. Candidatura ao Prémio BES Biodiversidade.
- MURISIER, F.; FERRETTI, M. and ZUFFEREY, V. (2001). Nouveaux systèmes de conduite pour les vignes en forte pente cultivées en banquettes. Essais sur Merlot au Tessin. 12^{èmes} Journées GESCO, Montpellier, 421-428.

- QUEIROZ, J.; CUNHA, M.; MAGALHÃES, A.; GUIMARAENS, D.; SOUSA, M.; BORGES, L. & CASTRO, R. (2009). "*Mountain viticulture and new training systems in narrow terraces - Douro region*". 16th International GIESCO Symposium, 2009, 487-492 – University of California, Davis, USA.
- QUEIROZ, J.; CUNHA, M.; MAGALHÃES, A.; GUIMARAENS, D.; SOUSA, M. e CASTRO, R. (2008a). "Narrow terraces and alternative training systems for steep sloop viticulture - Douro region". VIIth International Terroir Congress, 258-265 , Nyon (Switzerland), 19-23 May.
- QUEIROZ, J.; CUNHA, M.; MAGALHÃES, A.; GUIMARAENS, D.; SOUSA, M.; CAVADAS, P. and CASTRO, R. (2008b). Training systems in narrow terraces, Touriga National, Douro Region. CERVIM, Monforte de Lemos.
- SMART & ROBINSON (1991). Sunlight Into Wine; A Handbook for Wine Grape Canopy Arrangement. Winetitles. Australia.



O ENXOFRE É O PESTICIDA COM MAIOR CONSUMO EM PORTUGAL E NA VINHA

Pedro AMARO⁽¹⁾

RESUMO

Nas características toxicológicas e ecotoxicológicas do enxofre, analisam-se a **classificação toxicológica** e as **frases de risco e de segurança** adoptadas em Portugal nos **36** produtos formulados de **19** empresas, destacando a surpreendente **diversidade e insuficiência** de informação disponível, perante a decisão da UE, em **16/1/09**, de adopção da classificação **Xi e R38** e os novos conhecimentos sobre a toxicidade do enxofre para as **abelhas**, divulgados, em **19/12/08**, pela **EFSA**. O aumento do consumo de pesticidas em Portugal, entre a média de 1991 e 1992 e 2008, foi de **120%**, valor **máximo e destacado** dos países da UE e da OCDE. O **consumo de enxofre** correspondeu, em média, a **53%** do total de pesticidas e frequentemente foi superior a **10 000 t**. **Na vinha**, o **consumo de enxofre**, entre 1992 e 2003, variou entre **63%** e **85%**, com a média anual de **76%**. Esta muito significativa quantidade de enxofre na vinha, **exige particular atenção à sua problemática toxicológica e ecotoxicológica**.

Palavras – chave: enxofre, consumo pesticidas, ecotoxicologia, toxicologia, informação

1 - AS CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS E ECOTOXICOLÓGICAS DO ENXOFRE E AS CLASSIFICAÇÕES E INFORMAÇÃO EM PORTUGAL

1.1 - As características toxicológicas e ecotoxicológicas

A **classificação toxicológica** do perigo do produto técnico de **enxofre**, pela Organização Mundial de Saúde, é de **IRRITANTE para a pele e membranas mucosas**, com $LD50 > 3000$ mg/kg (20). O International Programme on Chemical Safety (IPCS) refere que: a substância activa (s.a.) enxofre irrita os olhos, a pele e as vias respiratórias; a inalação do pó de enxofre pode causar inflamação do nariz e das vias respiratórias; e o repetido ou prolongado contacto com a pele pode causar dermatite e nas vias respiratórias bronquite crónica, recomendando periódico exame médico consoante o grau de

¹ Instituto Superior de Agronomia, Univ. Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa.
pedroamaro@netcabo.pt

exposição. Como **medidas de segurança**, recomenda-se como Equipamento de Protecção Individual (EPI): luvas e equipamentos protectores dos olhos e das vias respiratórias (19). A avaliação pela European Food Safety Authority (EFSA) (14) e pela União Europeia (UE) (15) justificou a inclusão do **enxofre** no Anexo I da Directiva 91/914/CEE e classificou de **baixo risco**, com baixa toxicidade aguda, oral, dermal e por inalação, mas com a classificação toxicológica: **Xi, R38** “Irritante para a pele”.

Quanto à **ecotoxicologia**, a s.a. enxofre é considerada de **baixa toxicidade** para aves, mamíferos, organismos aquáticos, **abelhas**, outros artrópodes e minhocas. Contudo, **recomenda-se aos Estados Membros atenção particular para os riscos** para aves, mamíferos, artrópodes e organismos dos sedimentos, devendo ser adoptadas medidas de segurança quando apropriado (8,9). Quanto às **abelhas**, para doses de **enxofre entre 2,56 e 29,5kg s.a./ha** em vinha, foram registados **quocientes de risco** oral e de contacto superiores a 50: pó molhável <80 e pó <197 - <295,5. Como não foram referidas mortalidades de abelhas, admitiu-se ser o **risco baixo** e foi deixada aos **Estados Membros a ponderação do risco do uso** do enxofre e **de adopção de medidas de segurança** para defesa das abelhas (10,11,14).

Na Base de Dados *Footprint PPD*, da Univ. de Hertfordshire, UK, a toxicidade aguda do enxofre para o Homem é **Irritante** para: **vias respiratórias, olhos e pele** e, ainda: **HIGH** para peixes e invertebrados aquáticos; **MODERADA** para aves, mamíferos, algas, **abelhas** e outros artrópodes (*Aphidius rhopalosiphi*); e **BAIXA** para minhocas (17).

Na Base de Dados **Agritox**, da Agence Française de Sécurité Sanitaire (AFSSA), a classificação do enxofre é: **Xi, R38, S2, S46**, segundo a decisão da UE de **16/1/09** (1).

É evidente alguma diversidade de critérios dos especialistas sobre a **toxicidade do enxofre**, entre **Irritante** para a pele, as vias respiratórias, os olhos ou as membranas mucosas, com a preferência da EFSA e da UE por **R38 – Irritante para a pele**. Somente o IPCS (19) alerta para os riscos de inflamação do nariz e das vias respiratórias, de dermatite e de bronquite crónica e recomenda apoio médico e adequado EPI como **medida de segurança**.

1.2 - As classificações da Autoridade Fitossanitária Nacional, a DGADR e a informação disponível

O número de pesticidas simples à base de enxofre, referidos em publicações da DGADR, divulgadas em **2009**, é de **36** mas varia entre 32 (16,22) e 33 (12) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 – Número de fungicidas ou acaricidas, à base de enxofre, com diversos tipos de formulação e classificação toxicológica, em 3 publicações divulgadas, em 2009, pela DGADR (12,16,22).

| Publicação DGADR/AFN | Produto fitofarmacéutico nº | F A | | Tipo de formulação | | | | Classificação toxicológica | | | Data actualização |
|---|-----------------------------|-----|-----|--------------------|----|----|----|----------------------------|----|----|-------------------|
| | | nº | nº | DP | SC | WG | WP | Xi | Xn | Is | |
| Guia dos Produtos Fitofarmacéuticos. Lista dos Produtos com Venda Autorizada 2009 (Guia Amarelo) (22) | 32 | 28 | 4+3 | 6 | 9 | 10 | 7 | 15 | | 17 | 1-1-09 |
| Manual de Protecção Integrada e Agricultura Biológica da Vinha (16) | 32 | 32 | 3 | 7 | 9 | 9 | 7 | 14 | 1 | 17 | Maio 09 |
| Lista dos Produtos com Venda Autorizada 2009 (Internet) (12) | 33 | | | 7 | 9 | 11 | 6 | 14 | 1 | 18 | 31-12-09 |

F - fungicida; A - acaricida; DP – pó polvilhável; SC – suspensão concentrada; WG – grânulo dispersível na água; WP – pó molhável; Xi – Irritante, Xn – Nocivo; Is - Isento

Quadro 2 - Número de produtos fitofarmacéuticos, à base de enxofre, com diversos tipos de formulação, classificação toxicológica e frases de risco (12,16,22)

| Tipo de formulação | Classificação toxicológica | | | | | | Frases de risco (R) | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|----|----|-------|----|----|---------------------|-----|-----|-----|------------|----|---|
| | Xi | Xn | Is | Total | 36 | 37 | 38 | 41 | 43 | 100 | - | | |
| | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | | | |
| DP pó polvilhável | 1 | 1 | 6 | 75 | 8 | 22 | | | 100 | 100 | 100n | | |
| SC suspensão concentrada | 7 | 78 | 2 | 9 | 25 | | 100 | 500 | 100 | 100 | 400 10n | | |
| WG grânulo dispersível na água | 6 | 50 | 6 | 50 | 12 | 33 | | | | 500 | 100 | | |
| WP pó molhável | 2 | | 5 | 71 | 7 | 20 | | | 200 | | | | |
| Total nº | 16 | | 19 | | 36 | | 1 | 7 | 2 | 1 | 8 | 5 | 2 |
| % | 44 | | 53 | | | | 3 | 19 | 6 | 3 | 22 | 14 | |

Xi – Irritante, Xn – Nocivo; Is - Isento

No conjunto de **36 pesticidas** à base de enxofre, só 3 são referidos como acaricidas para combate a ácaros e erinose (16), mas no Guia “Amarelo” de 2009 são incluídos 7 insecticidas e acaricidas (22). Quanto a doenças, há 32 fungicidas para o oídio e 12 para a escoriose (16).

As **empresas** responsáveis pelos 36 pesticidas são **19**, mas a AZUFREIRA e os seus 2 fungicidas não são citados no Guia “Amarelo” e a AGRO-PERMU só ocorre

neste Guia (22). Enquanto cada uma de 12 empresas só comercializa 1 pesticida, verifica-se maior número de pesticidas para 7 empresas: 5 (AGROQUISA e SAPEC); 4 (NUFARM P e SELECTIS); e 2 (AZUFREIRA, BAYER e CEREXAGRI F) (Quadro 3).

Nos **tipos de formulação**, após os **grânulos**, WG (33%), ocorrem: suspensão concentrada, SC (25%), pó polvilhável, DP (22%) e pó molhável, WP (20%) (Quadro 2).

A **classificação toxicológica** adoptada pela DGADR (e a CATPF?) (3,4,5,6,7,9,10,11) privilegia o **Isento**, Is que predomina (53%), a par de Irritante, Xi (44%) e de Nocivo, Xn (3%) (Quadro 2).

A **relação entre classificação toxicológica e tipo de formulação** evidencia: predominio de **Xi** (78%) na suspensão concentrada (SC); maior frequência de **Is** no pó polvilhável (DP) (75%) e no pó molhável (WP) (71 %) e **Xi=Is=50%** nos grânulos (WG) (Quadro 2).

A par da **frase de risco** R100 num fungicida Isento da HEADLAND (Headland Sulphur) e de 2 pesticidas da AZUFREIRA, classificados de Xi e Xn sem outra frase de risco, verifica-se a ocorrência de 6 frases de risco, em 15 pesticidas, com a frequência em 36 pesticidas: R36 e R41 (3%); R38 (6%); R100 (14%); R37 (19%); e R43 (22%) (Quadro 2) (22).

Os **efeito secundários** dos acaricidas e fungicidas de enxofre, referidos no Manual de Protecção Integrada da Vinha (16), são considerados **Não Perigosos** para: ambiente, abelhas, organismos aquáticos, aves e fauna selvagem. Para alguns auxiliares (coccinélidos, antocorídeos, himenópteros e fitoseídeos) foram classificados de **Medianamente Tóxicos**.

Só **5 empresas**, ou seja **26%** das 19 com pesticidas de enxofre, **NÃO** apresentavam, na Internet, em 4/1/10, **fichas de dados de segurança**. Tal acontecia com: Agri-génese (1 Is); Agro-Permut (1 Xi); Azufrera (1 Xi, 1 Xn); Nufarm P (2 Is, 2 Xi) (Em manutenção); e Syngenta (1 Xi). A Epagro (1 Is) e a Selectis (2 Is e 2 Xi) condicionavam o acesso às Fichas a prévio *Username* e *Password*, não concedidos após solicitação (Quadro 3).

As **fichas de dados de segurança** são incluídas por **12 empresas (63%)**. No con-

junto de 4 empresas não havia fichas em 7 pesticidas: Agroquisa (3 Is: Enxofre Micro-nizado Agroquisa • Enxofre Molhável CC • Enxofre Plus); Sapec (2: Stulln FL (Xi) • Bago de Ouro- 4015 (Is)); Bayer (1 Is: Enxofre Bayer WG); e Cerexagri F (1 Xi: Super Six). No conjunto dos 36 produtos fitofarmacêuticos, a informação de fichas de dados de segurança só ocorria com 42% dos pesticidas (Quadro 3). **Em Portugal, não se conhecem dados de INQUÉRITOS dos efeitos do enxofre na SAÚDE DOS TRABALHADORES AGRÍCOLAS.** Há alguma informação sobre dermatites e ligeiras irritações da pele e, por vezes, dos olhos e das vias respiratórias, mas, afirma-se: “sem gravidade”. Aconselham-se os tratamentos ao fim do dia ou de noite e o uso de EPI adequado, mas não há dados rigorosos sobre a frequência do seu uso.

Quadro 3 – Disponibilidade Sim ou Não, na Internet em 4/1/10, de **Fichas de Dados de Segurança** dos 36 pesticidas à base de enxofre de 19 empresas

| Disponibilidade SIM e NÃO | | | | Disponibilidade NÃO | | | |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------|----|----|
| Empresa | Pesticida nº | Disponibilidade | | Empresa | Pesticida nº | Tf | Ct |
| | | SIM | NÃO | | | | |
| Agroquisa | 5 | Xi Is | Is Is Is | Agrigénese | 1 | DP | Is |
| Sapec | 5 | Is Is Is | Xi Is | Agro-Pemu | 1 | WP | Xi |
| Bayer | 2 | Xi | Is | Azufrera | 1 | WG | Xi |
| Cerexagri F | 2 | Xi | Xi | | 1 | DP | Xn |
| Cerexagri SA | 1 | Is | | Epagro (*) | 1 | WP | Is |
| Action Pin | 1 | Xi | | Nufarm P (**) | 1 | DP | Is |
| Arysta | 1 | Xi | | | 1 | SC | Xi |
| Basf | 1 | Xi | | | 1 | WG | Is |
| Headland | 1 | Is | | | 1 | WP | Xi |
| Inagra | 1 | Is (***) | | Selects (*) | 1 | DP | Is |
| Lainco | 1 | Xi | | | 1 | SC | Xi |
| Quimagro | 1 | Is | | | 1 | WG | Xi |
| | | | | | 1 | WP | Is |
| | | | | Syngenta | 1 | WG | Xi |
| TOTAL nº | 22 | 15 | 7 | TOTAL nº | 14 | | |
| % | | 42 | 19 | % | 39 | | |

Tf – Tipo de formulação; Ct – Classificação toxicológica; Xi – Irritante; Xn – Nocivo; Is - Isento ; DP – pó polvilhável; SC – suspensão concentrada; WG – grânulo dispersível na água; WP– pó molhável; (*) – acesso às fichas de dados de segurança não permitido por ausência de *Username e Password*; (**) – Em manutenção; (***) – Classificado em Espanha (Sipcam) de Xi, R36737/38

2 - A GRANDE IMPORTÂNCIA DO ENXOFRE NO CONSUMO DOS PESTICIDAS EM PORTUGAL E EM ESPECIAL NA VINHA

2.1 - O aumento do consumo de pesticidas, em 1990-2002, e a situação ímpar de Portugal na UE e na OCDE

O consumo de pesticidas em Portugal, em 1991-1992, foi de **7736 t** (9355+6117:2), aumentando até **17 451 t** em 2002, ou **seja >126%**, e depois com redução até 15 703 t, em 2006, e posterior aumento, atingindo, em 2008, **17 060 t, isto é >121%** (Fig. 1).

No conjunto de **27 países da OCDE**, entre 1990-92 e 2000-02, **Portugal** destaca-se isolado com o **aumento de 100%**, no consumo de pesticidas, após **Turquia, Polónia e Grécia**, próximos de **40%** e **Itália, Espanha, México e EUA** com **1-12%**. A **redução** de consumo de 10-60% foi registada em 12 países (ex: 10% - **Alemanha**; 20% - **Áustria, Japão**; 30% - **Suíça**; **40-60%** - **Dinamarca, Holanda, Hungria**) (Fig. 2).

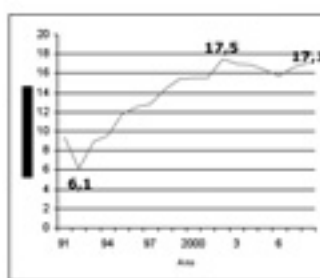


Fig. 1 - Evolução das vendas, em toneladas de s.a. de pesticidas, entre 1991-92 e 2008, em Portugal (4,5,8,11)

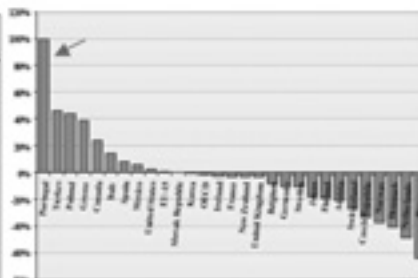


Fig. 2 - Aumento ou redução do consumo de pesticidas, em percentagem, entre 1990-92 e 2000-02, em 27 países da OCDE (8,10,18)

2.2 - O consumo de enxofre e de outros pesticidas, desde 1991, em Portugal

Enquanto o consumo da s.a. enxofre, em 1992, foi só de 2017 t, as **10 000 t** foram ultrapassadas em: 2002 (10 609); 2003 (10 233); e 2005 (10 291 t). Os totais de produtos formulados de enxofre atingiram **20 000 t** em 1953 e **15 306 t** em 1969 (2,8,13).

Dados da DGADR (8) do consumo de **enxofre** em relação ao consumo total de pesticidas, em **todas as culturas** em Portugal, entre **1991 e 2008**, revelam a média anual

de **53%**, com **33%** em 1992 e **63%** em 2005, e valores >50% em 1995 e 1996 e 2001-2008 (Fig. 3).

O consumo de enxofre em **relação** ao total de pesticidas, na **vinha**, de **1992 a 2003**, atingiu a média anual de **76%**, com **63%** em 1998 e **85%** em 2002 e 2003 (dados do Eurostat (21)). A influência do enxofre no aumento do consumo dos pesticidas é bem evidente na Fig.4.

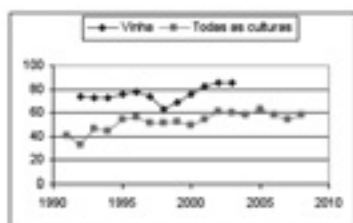


Fig. 3 - Evolução da **relação (%)** entre o consumo de enxofre e o consumo do total de pesticidas, na **vinha** ou em **todas as culturas** em Portugal (s,t)

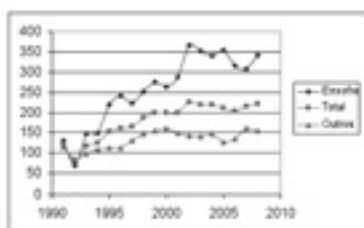


Fig. 4 - Evolução do consumo de pesticidas (Enxofre, Outros e Total), em toneladas de s.a., entre 1991-92 e 2008, em Portugal. Índice 1991/92=100. Dados DGADR (3)

O **TOTAL DE PESTICIDAS**, com tendência crescente desde 1992, atinge o **máximo (226)** em 2002, e o aumento de **126%**. Depois, verificou-se redução até 203 em 2006 e novo aumento em 2007 (216) e 2008 (221), perto do máximo, ou seja **121%**, (Fig. 1,4).

A grande predominância do **ENXOFRE**, no conjunto dos pesticidas, é evidenciada pelos valores mais elevados do aumento do seu consumo em comparação com o referido para o total dos pesticidas. A evidência da tendência crescente do consumo do enxofre ocorre entre 1992 e 2002, já com **119%** (219) em 1995 e o **máximo 265%** (365) em 2002. Depois, há redução até 2007, com 308, e aumento em 2008, com **242%** (342) (Fig. 4).

Para o **CONJUNTO DE PESTICIDAS, mas não incluindo o enxofre (OUTROS)**, mantém-se, de forma mais moderada, a tendência crescente do seu consumo, desde 1994 (109) até ao **máximo (161)**, ou seja **61%**, em 2000. Depois, ocorre a redução até 2005 com 126 e aumento até **60%** (160) em 2007 e redução em 2008 a **48%** (148) (Fig. 4).

A importância do consumo de enxofre, na cultura da vinha, na região Mediterrânica, é evidenciada por dados de 5 países, entre **1992 e 2003**, do EUROSTAT. A **Grécia** surge em 1º lugar com valores >60% (63-83%), à excepção de 2003 (48%). **Espanha** (32-76%), **Itália** (31-67%) e **Portugal** (43-72%) ocupam posição intermédia. A **França** evidencia a maior uniformidade (30-43%) e os valores mais reduzidos (Fig.5).

Verificam-se diferenças, por vezes muito significativas (ex. 28% em 1992 e 10-14% em 5 anos), entre os dados, de 1992 a 2003, do Eurostat e de CNPPA/DGPC/DGADR relativos a Portugal e, à excepção de 1998 e 1999, os do Eurostat são mais elevados (Fig. 3 e 5).

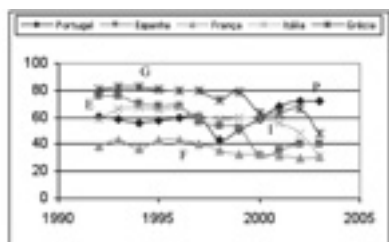


Fig. 5 – A evolução, entre 1992 e 2003, do consumo de enxofre, em t s.a. e % do total de pesticidas, em 5 países. EUROSTAT (8,21)

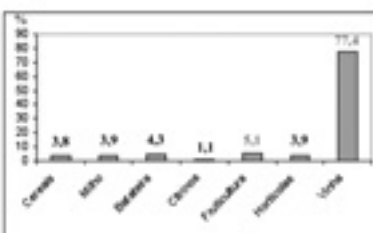


Fig. 6 – Consumo de pesticidas, médio (1992 - 2003), expresso em percentagem do total anual, em 7 culturas. EUROSTAT (11, 21)

3 - O RISCO DA TOXIDADE DE ELEVADAS QUANTIDADES DE ENXOFRE NA VINHA PARA A SAÚDE HUMANA E AS ABELHAS

A **vinha** é a cultura com o **mais elevado** consumo de pesticidas em Portugal. Entre 1992 e 2003, a média anual foi de **77,4 %**. Noutras 6 culturas ocorreu: **5,1 %** (fruticultura); **4,3%** (batateira); **3,9%** (hortícolas e milho); **3,8%** (cereais); e **1,1%** (citrinos) (Fig. 6) (11,21).

Perante o facto de Portugal se destacar isolado, entre 1990-92 e 2000-02, com o **maior aumento (100%) de consumo de pesticidas em 27 países da OCDE** (Fig.2) e de esse aumento ser claramente influenciado pelo **muito elevado consumo de enxofre**, em especial na **VINHA** (Fig.4) e em países Mediterrânicos (Fig, 5), e que atingiu **265%** em 2002 e **242%** em 2008 (**10 000t**) (Fig.4), será de admitir: particular atenção, urgência

e rigor à **informação** e às **decisões** da **DGADR** (e da Comissão de Avaliação Toxicológica dos Produtos Fitofarmacêuticos, a **CATPF?**) e das **Empresas de Pesticidas** sobre **classificações toxicológica e ecotoxicológica** do enxofre e **medidas de segurança**; e aos **Serviços de SAÚDE** iniciativas para melhor esclarecimento dos efeitos do enxofre na saúde dos trabalhadores agrícolas.

Em **CONCLUSÃO**, é oportuno considerar **algumas questões**:

Parante a **classificação** pela UE (15) de **Xi R38**, referida em **16/1/09** pela AFSSA em França (1), baseada na *Peer review of the pesticide risk assesment of the active substance sulfur*, de **19/12/08**, da EFSA (14), como justifica a **DGADR** a **CLASSIFICAÇÃO** de **Is (ISENTO)** a 17-18 enxofres, a par de 16 **Xi**, em três publicações de **2009** (Quadros 1 e 2)?

A **DGADR** ignora a elevada ausência de divulgação de **FICHAS DE DADOS DE SEGURANÇA** pelas empresas de pesticidas (Quadro 3)?

A **DGADR** (e a **CATPF?**) vai **manter o silêncio**, em Portugal, perante os **quocientes de risco**, base da proposta dos Estados Membros da UE procederem, para a **defesa das abelhas**, “à **PONDERAÇÃO do risco do uso do enxofre e de adopção de medidas de segurança**”(14)?

4. É evidente que a sistemática **ausência ou precariedade** de **INFORMAÇÃO** relativa às **classificações toxicológica e ecotoxicológica** e às **medidas de segurança** dos pesticidas, já anteriormente evidenciada (3,4,5), **umenta os riscos do uso do enxofre** para a saúde humana e para o ambiente, em particular as **abelhas**, riscos potenciados pelas elevadas quantidades, em especial na **vinha** em Portugal. E nada alterará esta lamentável realidade?

5. Tão elevadas quantidades de enxofre (cerca de **10 000 t** em 2000 – 2005 e 2008) e a sua acção **IRRITANTE PARA A PELE (R38)**, consagrada pela **EFSA** em Dezembro de **2008**, não serão suficientes para justificar uma iniciativa dos Serviços de Saúde para melhor esclarecimento das consequências **na saúde** dos trabalhadores agrícolas?

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRITOX (2009). *Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. Soufre*. AFSSA.
2. AMARO P. (2003). *A protecção integrada*. ISA/Press, Lisboa, 446 p.
3. AMARO P. (2007). *A política de redução dos riscos dos pesticidas em Portugal*. ISA/Press, Lisboa, 167 p.
4. AMARO P. (2008). Dos pesticidas maravilha à crescente preocupação com os pesticidas. *Colóq. Fármacos Saúde e Ambiente*, Lisboa, Nov. 08. Soc. Científica, Univ. Católica Portuguesa. *Cadernos*, **8**: 29-50.
5. AMARO P. (2010). As actuais dificuldades na protecção das plantas e a nova legislação dos pesticidas. *Vida Rural*, **1755**:38-40.
6. AMARO P. (2009). Já há muito tempo que os pesticidas matam as abelhas. *O Apicultor*, **64**: 29 – 40.
7. AMARO P. (2009). Pesticidas e abelhas na vinha. *O Apicultor*, **65**: 15 – 22.
8. AMARO. P. (2009). A evolução do consumo de pesticidas em Portugal e na União Europeia. *Espaço Rural*, **71**:13-17.
9. AMARO P. (2009). A toxicidade dos pesticidas para as abelhas em Portugal. *Revta APH*, **99**: 32-40.
10. AMARO P. (2009). É indispensável e urgente reduzir os elevados riscos de mortalidade das abelhas pelos pesticidas 10º Fórum nac. Apicult. Ourém, Nov.09. *O Apicultor*, **67**: 3-14.
11. AMARO P. (2010). A defesa das abelhas no uso dos pesticidas em pomóideas. *2º Simp .nac. Frutic., C. Branco, Fev.2010*: 272-283.
12. ANÓNIMO (2009). *Guia dos produtos com venda autorizada*. Edição 2009 (Atualizada a 31/12/09). DGADR, Internet.
13. DGADR (2009). *Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2008*, 1-17. DSPFSV-5/09.
14. EFSA (2008). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assesement of the active substance sulfur. *EFSA Scientific Report (2008)* **221**, 70 p.
15. EUROPEAN COMMISSION (2009). *Review report for the active substance sulphur*. SANCO/2676/08 – final. 22/10/09.
16. FÉLIX A..P. & CAVACO M. (2009). *Manual de protecção fitossanitária para protecção inte-*

grada e agricultura biológica da vinha. DGADR-DSPFSV, DABSV-7/09..98 p. e Anexos.

17. FOOTPRINT (2006). *The footprint pesticides properties database*. Univ. Hertfordshire. UK. IUPAC.
18. HERBKE N., DWORAK T. & KARACZUN Z.M. (2006). *WFD and Agriculture – Analysis of the pressures and impacts. Interim report – 18/10/06*. 41p.
19. IPCS (2001). *Peer-review of sulfur. April 2000*. ICSC 1166.
20. IPCS (2006). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004*. IOMC. 56p.
21. NADIN P. (Ed.) (2007). *The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-2003*. Eurostat.
22. OLIVEIRA A.B. & HENRIQUES M. (2009). *Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada*. DGADR, 249p.



PROFILER⁰: UM NOVO E INOVADOR FUNGICIDA SISTÉMICO CONTRA MÍLDIO DA Videira (*Plasmopara viticola*) (Berk.et Curt.) Berl. et De Toni

João VILA-MAIOR⁽¹⁾; Jorge VIÇOSO⁽²⁾; António VILLALOBOS⁽³⁾

RESUMO:

PROFILER⁰ é um novo fungicida sistémico contra o míldio da videira (*Plasmopara viticola*) (Berk.et Curt.)Berl.et De Toni. A sua formulação combina duas substâncias activas, **fluopicolida** e fosetil-Al. A **fluopicolida**, pertencente à família química das Benzamidas, é uma nova e inovadora substância activa com um modo de acção único que, por isso, não apresenta qualquer tipo de resistências cruzadas, pelo que, é ideal para ser utilizado em alternância com outras famílias químicas. **PROFILER⁰**, aliando a **fluopicolida** ao fosetil-Al, é primeiro fungicida anti-míldio a associar uma substância sistémica a uma não de contacto. Tem grande eficácia preventiva, actuando desde a fase dos conídios à germinação dos zoósporos e uma eficácia, não negligenciável, embora que menor, curativa e anti-esporulante, actuando após a germinação dos zoósporos e a esporulação. A nível bioquímico, a **fluopicolida** actua sobre as proteínas tipo espectrina que fazem “a ponte” entra a membrana celular e o cito-esqueleto, produzindo a sua deslocalização da periferia para dentro do citoplasma e, desta forma, provocando o colapso das células do fungo. Para além da acção preventiva é de realçar, ainda, o efeito indutor de resistências naturais da planta. **PROFILER⁰** é bem tolerado por todas as castas de videira e não tem acção negativa nas características organolépticas da uva, nem nos seus processos de vinificação. Um perfil toxicológico e ecotoxicológico favorável, tornam este produto enquadrável em protecção integrada.

Palavras chave: fluopicolida, benzamida, sistémico, míldio, *Plasmopara viticola*, anti-resistência, alternância, protecção integrada.

1 - INTRODUÇÃO

O míldio da videira é oriundo da América do Norte e foi assinalado pela primeira vez na Europa, em França, mais concretamente na região da Gironda em 1879. Depois

¹ joao.vilamaior@bayercropscience.com

Bayer CropScience – R.Quinta do Pinheiro,5 - 2794-003 CARNAXIDE Portugal

² jorge.vicoso@bayercropscience.com

Bayer CropScience – R.Quinta do Pinheiro,5 - 2794-003 CARNAXIDE Portugal

³ antonio.villalobos@bayercropscience.com

Bayer CropScience – R.Quinta do Pinheiro,5 - 2794-003 CARNAXIDE Portugal

de 1880 esta doença expandiu-se por toda a Europa e, posteriormente, praticamente pelo mundo inteiro. (Dubos, 1999).

As doenças causadas por fungos da classe Oomiceta (míldios) têm gradualmente aumentado de importância devido aos severos efeitos que provocam nas culturas, quantitativos e qualitativos, e à sua rápida capacidade de desenvolverem resistências contra os fungicidas específicos (BAYER AG, 1999).

Com as alterações climáticas, doenças que, actualmente, já se controlam com alguma dificuldade, como é o caso do míldio, poderão vir a ter um desenvolvimento explosivo e destruidor, fruto do aumento da temperatura média e da precipitação no período invernal (BUGARET, 2009).

Em Portugal, só os antimíldios da vinha representam 21% do mercado da protecção das plantas (Antunes et al, 2007).

PROFILERÒ, um novo fungicida resultado da investigação da Bayer CropScience, constitui uma inovadora solução anti-míldio que reúne o já conhecido fosetil-Al, de eficácia comprovada, com uma nova substância activa, a fluopicolida, com características muito próprias que permitem posicionar esta solução fungicida na altura de maior sensibilidade à doença, isto é, ao redor da floração.

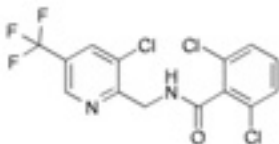
2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Nome comum: fluopicolida

Família química: Benzamida

Fórmula molecular: $C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$

Fórmula estrutural:



Nome químico (IUPAC): 2,6 dicloro-N-{[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]-metil} benzamida

Estado físico: Pó
 Cor: Bege
 Odor: Sem odor característico
 Ponto de fusão: 150 °C
 Pressão de vapor: $8,03 \times 10^{-7}$ Pa a 25°C
 Peso molecular: 383,59 g/mole
 Solubilidade em água: 2,80 mg/litro a pH 7 (20°C)
 Coeficiente n-octanol-água: $\log P_{OW} = 2,9$ (25°C)
 Densidade relativa: 1,73 g/cm³
 (Latorse, M.P. *et al.*, 2006)

3 - CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS

Quadro 1 – Características toxicológicas da fluopicolida em mamíferos.

| | |
|---|----------------------------------|
| Toxicidade oral aguda (ratarama) | LD ₅₀ >5000 mg/kg |
| Toxicidade dermal aguda (ratarama) | LD ₅₀ >5000 mg/kg |
| Toxicidade aguda por inalação, 4 h, LC50 (ratarama) | > 5160 mg a.i./m ³ ar |
| Irritação ocular (coelho) | Não irritante |
| Irritação cutânea (coelho) | Não irritante |
| Sensibilização (porco da índia) | Sem sensibilização |
| Carcinogenia | Sem propriedades carcinogénicas |
| Efeitos na reprodução | Sem efeito específico |
| Embriotoxicidade | Sem embriotoxicidade potencial |
| Teratogenia | Sem efeito teratogénico |
| Mutagenia | Sem potencial mutagénico |

(Latorse, M.P. *et al.*, 2006)

Quadro 2 – Toxicidade na fauna selvagem

| | |
|-----------------------------------|---|
| Aves | |
| Codornizes | Oral aguda, LD50=2250 mg/kg |
| Pato Selvagem | Oral aguda LD50=2250 mg/kg |
| Peixes | |
| Tonta arco-íris | Aguda (96 h), LC50 = 0,36 mg/l |
| Peixe Bluegill | Aguda (96 h), LC50 = 0,75 mg/l |
| Invertebrados (Daphnia magna) | Aguda (48 h), LC50=0,75 mg/l |
| Algae (Selenastrum capricornutum) | Inibição do crescimento (72 h), EC50=4,3 mg/l |
| Planta (Lemna gibba) | Inibição do crescimento (7 d), EC50=3,2 mg/l |

(Latorse, M.P. *et al.*, 2006)

Quadro 3 – Toxicidade nos organismos auxiliares

| | |
|-------------------|---|
| Auxiliares | |
| Mirícocha | Aguda (14 d), LC50=1000 a.i./kg de solo |
| Abelha | Contacto, LD50=100 µg/abelha |
| Typhlodromus | Aguda LR50 0,313 Kg/ha |
| Aphidius | Aguda LR50 0,419 Kg/ha |

(Latorse, M.P. *et al.*, 2006)

A fluopicolida, por apresentar um perfil ecotoxicológico muito favorável, revelando-se inócuo para os principais organismos auxiliares, com especial destaque para os ácaros fitoseídios, enquadra-se num programa de Protecção Integrada. PROFILERÒ, em Portugal, já foi incluído nas listas de Protecção integrada da vinha (DGADR, 2009) (Quadros 1, 2 e 3).

4 - MODO DE ACÇÃO

4.1 - Modo de acção biológico

A fluopicolida, sob o ponto de vista biológico, possui uma actividade preventiva, curativa e anti-esporulante, sendo, contudo, a actividade prevalente a preventiva (figura 1).

A fluopicolida provoca a inibição da mobilidade dos zoósporos a concentrações muito baixas (LC90 = 2,5 ppm). Observações microscópicas demonstram que o movimento dos zoósporos cessa em menos de um minuto, sucedendo-se a sua destruição (Tafforeau et al 2005).

Estudos laboratoriais demonstraram também que a fluopicolida é activa nos tecidos da planta inibindo a esporulação e crescimento micelar. A lise do micélio é efectiva em *P. infestans* e *Phythium ultimum* após o tratamento (Tafforeau et al 2005).

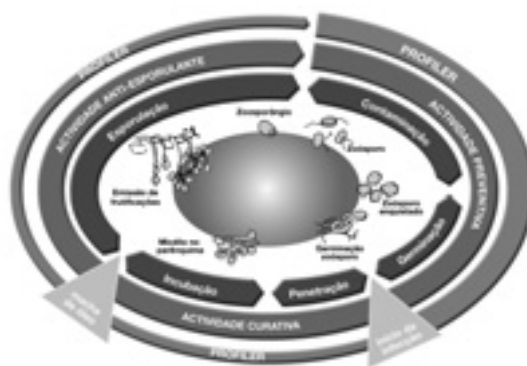


Figura 1 - Modo de acção Biológico (Adaptado de BAYER CROPSCIENCE, 2009)

4.2 - Modo de acção bioquímico

A fluopicolida apresenta um modo de acção absolutamente inovador e único. Estudos bioquímicos, conduzidos de acordo com métodos padrão, mostraram que o modo de acção da fluopicolida é claramente distinto do fluaziname (fosforilação oxidativa), do metalaxil (síntese do rRNA) e estrobilurinas ou outros inibidores do complexo II da respiração celular, como a fenamidona. Também se verificou que a fluopicolida não tem efeito in vitro na polimerização da tubulina (zoxamida) (Tafforeau et al 2005).

Pelo modo de acção ímpar característico da fluopicolida, a FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), entidade que zela pela monitorização da eficácia dos fungicidas bem como pelas boas práticas conducentes à sua maior efectividade, criou um novo grupo (FRAC 43) para tipificar este modo de acção, no qual a fluopicolida é a única substância activa presente (FRAC, 2009).

A acção da fluopicolida faz-se sentir na membrana celular, mais concretamente ao nível das Proteínas tipo Spectrina, promovendo a sua deslocalização da periferia da célula para o citoplasma. Estas proteínas fazem a ponte entre a membrana plasmática e a componente actina do cito-esqueleto e, função da referida deslocalização, promovem uma desorganização interna da célula do fungo e o seu consequente colapso. Esta acção verifica-se ao nível dos zoósporos e das hifas do micélio (Toquin et al, 2006).

4.3 - Sistemias e translocação

Estudos efectuados em estufa e com marcadores rádio demonstraram, em várias espécies de plantas, que a fluopicolida tem uma sistemias acrópeta, via xilema, ao nível do órgão tratado. Quando aplicado na base do pecíolo da folha a fluopicolida é rapidamente transportada pelo limbo até à extremidade da folha. A fluopicolida tem, ainda, uma boa acção translaminar. A aplicação na página superior da folha protege a página inferior e vice-versa. Quando aplicada na base ou no pecíolo da folha, a fluopicolida rapidamente se move para o topo da folha. Da mesma forma, o tratamento de rebentos e lançamentos jovens protege as folhas que se desenvolvem posteriormente. A fluopicolida não tem sistemias basípeta, não é volátil nem se redistribui por vapor (Tafforeau et al 2005).

O fosetil-Al, a substância activa que coexiste com a fluopicolida no PROFILERÒ, tem sistemias acrópeta e basípeta pelo que, PROFILERÒ, tem uma grande mobilidade

na planta: sistemias acrópeta por via da Fluopicolida e do fosetil-AI; sistemias basípeta por via do fosetil-AI e acção translaminar por via da fluopicolida.

5 - CARACTERÍSTICAS GERAIS

5.1 - Formulação

O PROFILER⁰ apresenta-se na formulação de grânulos dispersíveis em água (WG). Com 4,4% (p/p) de fluopicolida e 66,6 % de Fosetil-AI. Toxicologicamente tem a classificação Xi e N. Tem a APV nº 4012 concedida pela DGADR.

5.2 - Condições de aplicação e posicionamento

O PROFILER⁰ deve ser aplicado numa dose de 2,5 Kg/há. No caso dum volume de calda de 1000 por hectare representaria uma concentração 250 g/100 litros de água. Relativamente a compatibilidades, não deverá ser misturado com fungicidas cúpricos nem com adubos azotados.

Embora possa ser posicionado em todo o ciclo vegetativo da videira, entende-se que a fase em que PROFILER⁰ pode demarcar-se da generalidade dos fungicidas, é o período que vai desde os cachos visíveis ao bago de ervilha. Neste período, que compreende a floração, período de grande sensibilidade ao míldio, e em que a vinha apresenta uma grande dinâmica de crescimento, PROFILER⁰, fruto da grande sistemias e acção translaminar que apresenta, tem uma eficácia e capacidade notável de acompanhar o crescimento da planta.

Por não conter substâncias de contacto, PROFILER⁰ diferencia-se relativamente aos resíduos associados. Esta característica assume uma importância especial quando se fala em uvas de mesa dadas as regras actualmente vigentes, ainda mais rigorosas que as inerentes às uvas para a produção de vinho.

6 - EXPERIMENTAÇÃO EM PORTUGAL

PROFILER⁰ foi testado em Portugal pela primeira vez no ano de 2003. Durante seis anos foram realizados ensaios de eficácia e selectividade, em várias regiões do país, com especial prevalência na região de maior incidência da doença, o Minho (figura 2).

Todos os ensaios de eficácia biológica do **PROFILER⁰** efectuados em Portugal foram conduzidos pela Bayer CropScience Portugal e pela empresa Unipessoal BM (organizações oficialmente reconhecidas para realização de ensaios de eficácia – OOR, certificados n^{os} 11 e 15, respectivamente).

PROFILER⁰ revelou uma elevada eficácia, tanto ao nível da protecção dos cachos como das folhas, mesmo em anos de grande severidade. No decorrer dos ensaios realizados não se registou qualquer tipo de fitotoxicidade nem a ocorrência de fenómenos de resistências. (Villalobos, 2010)

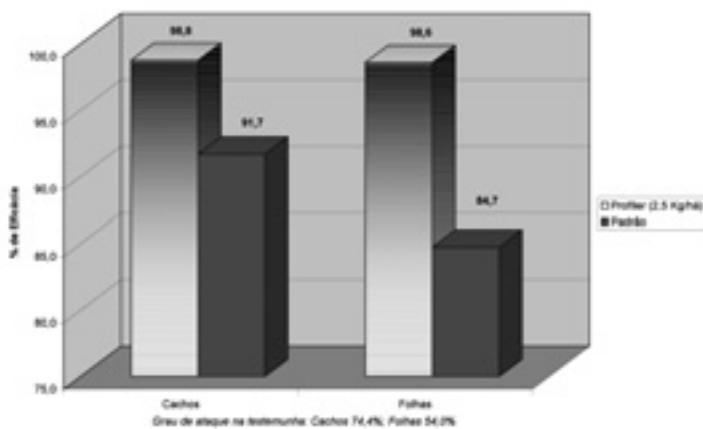


Figura 2 - Resultado de 6 anos de ensaios: valores médios (Villalobos, 2010)

7 -CONCLUSÕES

O **PROFILER[®]** é um fungicida antimíldio da videira, que alia duas substâncias activas sistémicas: a fluopicolida (benzamida) e o fosetil-Al (fosfonato).

Tem grande mobilidade na planta, acrópeta via fluopicolida e fosetil-Al e basípeta via fosetil-Al e, ainda, acção translaminar por via da fluopicolida.

Tem essencialmente uma acção preventiva, e deve ser utilizado como preventivo. Contudo, tem ainda uma acção curativa e anti-esporulante.

Tem um modo de acção novo e inovador. Actua sobre as proteínas tipo espectrina, provocando a sua deslocalização e conseqüente desorganização e morte do fungo. Fruto do modo de acção único e distinto das demais famílias de substâncias activas, não apresenta resistências cruzadas e assume-se como muito interessante numa estratégia anti-resistências.

Deve ser utilizado em alternância com fungicidas pertencentes a outras famílias químicas e não devem ser excedidas três aplicações por campanha.

Tem um bom perfil ecotoxicológico e está recomendado para programas de protecção integrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A., VILLALOBOS, A., SILVA, J. (2007). Melody[®] Super: Um fungicida sistémico contra fungos da classe dos oomicetas, *nomeadamente mildio da videira Plasmora vitícola*. *Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, Évora.

BAYER AG (1999). Melody - Active ingredient: iprovalicarb. *Product dossier*.

BAYER CROPSCIENCE (2009). R6Erresei Albis – L'innovazione fungicida contro la peronospora della vite, Milão

BUGARET, Y. (2009). LE CHANGEMENT CLIMATIQUE: Un sujet de préoccupation majeur pour l'avenir de la viticulture. *1^a Conferência Ibérica de Viticultura e Enologia*. ISA, Lisboa

DGADR, (2009). Parecer DGADR MPI / 141 / 09.

DUBOS, B, (1999). Maladies cryptogamiques de la vigne, 37.

FRAC (2009). (www.frac.info)

LATORSE, M.P., SAUZY, S., KEYZER, A., DIDIER, D., TAFFOREAU. Fluopicolide, nouveau fungicide a mode d'action original pour la protection contre les oomycetes. 8eme Conference Internationale sur les Maladies des Plantes Tours- 5 et 6 Décembre 2006.

TAFFOREAU, S., WEGMANN, T., LATORSE, M.P., GOUOT, J.M., DUVERT, P., BARDSLEY, E. (2005). Fluopicolide, a novel fungicide with a unique mode of action, setting a new standard for Oomycete control. Glasgow.

TOQUIN, V., BARJA, F, SIRVEN, C., GAMET, S., LATORSE, M.P., ZUNDEL, J.L., SCHIMITT, F., BEFFA, R. (2006). A new mode of action for fluopicolide: modification of cellular localization of a spectrin-like protein. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 59, 2 – 3, pág. 171.

VILLALOBOS, A. (2010). Comunicação pessoal.



INTERNACIONALIZAÇÃO DAS EMPRESAS DO SECTOR VITIVINÍCOLA PORTUGUÊS: UMA METODOLOGIA DE ABORDAGEM ESTRATÉGICA

Carla VIVAS¹; António SOUSA²

RESUMO:

O surgimento de novos países produtores no sector vitivinícola, com manchas de plantação de vinha e produção de vinho muito significativas, crescentes e concorrentes com os maiores produtores tradicionais do mundo e com forte orientação para o mercado externo, a queda das barreiras alfandegárias (Organização Mundial do Comércio) e das especificidades da União Europeia (Organização Comum do Mercado do Vinho) levaram a uma intensificação da competição a nível global. Tal contexto conduz as empresas do sector em Portugal a encetar processos de transformação profundos assentes em novas orientações estratégicas. Com o objectivo de compreender as estruturas e estratégias desenvolvidas por essas empresas, no âmbito internacional, propõe-se uma metodologia centrada num modelo de abordagem constituído especificamente para o efeito: a GIRE(i) – *Grelha Integrada de Reflexão Estratégica*, que engloba uma caracterização em termos de recursos e explora a vertente estratégica articulando factores contingentes, internos e externos, tipos de reflexão/acção estratégica e performance económica.

PALAVRAS-CHAVE: Gestão Estratégica, Internacionalização, Sector Vitivinícola, Vinho.

1. INTRODUÇÃO

Embora ainda com um papel dominante, a Europa (em geral e a União Europeia em particular) apresentou, nos últimos anos, algum decréscimo em termos de importância no sector, dado terem surgido países como os da América do Sul, EUA, África do Sul, Austrália e recentemente alguns países da Ásia, que têm conquistado posições a diversos níveis – área de vinha, produção, exportação/mercado internacional.

¹ Escola Superior de Gestão e Tecnologia - Instituto Politécnico de Santarém - Complexo Andaluz, Apartado 295 | 2001-904 Santarém | Portugal | E-mail: carla.vivas@esg.ipsantarém.pt

² Universidade de Évora - Departamento de Gestão - CEFAGE - Largo dos Colegiais 2 | 7004-516 Évora | Portugal | E-mail: ajcs@uevora.pt

Todas estas transformações terão consequências para o sector em Portugal, onde a cultura da vinha e o vinho têm uma grande importância para o sector agrícola, e consequentemente, para a economia portuguesa. O mercado externo, que tradicionalmente servia para escoar os excedentes, passou a ser visto como um mercado alternativo, e até mesmo preferencial. As empresas nacionais do sector vêm-se, desta forma, obrigadas a encetar processos de transformação profundos assentes em novas orientações estratégicas.

Parante este cenário, justifica-se uma análise/reflexão sobre a orientação estratégica e a transformação de estruturas nas empresas do sector, na sua abordagem ao processo de internacionalização. Propõe-se para tal, neste trabalho tal como no estudo de investigação actualmente em curso, a aplicação do referencial metodológico desenvolvido por Sousa (2000) e designado de Grelha Integrada de Reflexão Estratégica (GIRE), adaptada a um contexto de internacionalização.

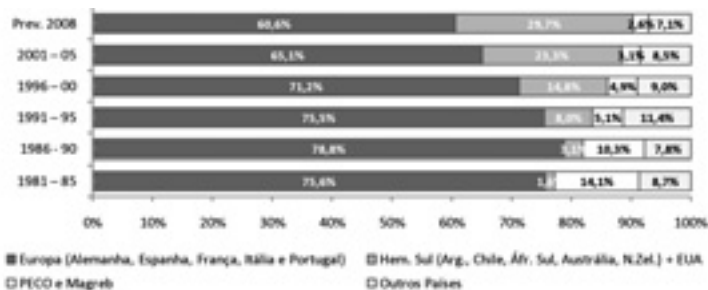
Na secção seguinte pretende-se ilustrar de uma forma breve o cenário actual do sector vitivinícola mundial, nomeadamente no que diz respeito aos principais actores e magnitude das trocas comerciais internacionais, seguindo-se, na terceira secção, a caracterização da GIRE e a sua adaptação proposta - GIRE (i). Termina-se com breves considerações finais.

2. O SECTOR VITIVINÍCOLA MUNDIAL: BATALHA “GLOBAL” E REDEFINIÇÃO DE ACTORES

Actualmente o sector vitivinícola pode caracterizar-se como uma “batalha global”. Apesar dos Países Tradicionalmente Produtores (PTP) ainda ocuparem uma posição de topo na lista dos produtores mundiais, existe a grande preocupação de resolver o *gap* entre a produção e o consumo doméstico, que na maior parte das empresas, passa por prestar maior atenção ao mercado de exportação (Campbell & Guibert, 2006).

A par da crescente globalização dos mercados verifica-se uma redefinição dos actores (ver Figura 1) num mercado em maturidade, caracterizado por uma sofisticação dos produtos (grandes exigências dos consumidores em termos de segmentação da oferta e qualidade de serviço) e por uma intensificação da concorrência e concentração da oferta (Porter, 1990).

Figura 1 – Distribuição regional do comércio mundial do vinho



Fonte: Elaboração própria a partir de dados da OIV

Coexistem dois modelos “contraditórios” - a tradição de uma região *versus* o liberalismo industrial (Martin, 2007) - destacando-se um importante paradoxo: de um lado, a importância do *terroir* (com referência à origem) e de outro, as castas, reconhecidas internacionalmente (ver Quadro 1).

Quadro 1 – Dois modelos diferentes no mercado

| Dimensões | Países Tradicionalmente Produtores (PTP) | Novos Países Produtores (NPP) |
|------------------------------|---|--|
| LOCALIZAÇÃO | Europa | América, Austrália e África do Sul |
| ACTIVIDADE | Tradicional agro-industrial | Industrial comercial |
| DIFERENCIAÇÃO | Pela origem (DO) | Pela marca e variedade |
| MODERNIZAÇÃO | Melhor qualidade | Redução de custos |
| ESTRATÉGIA | Imagem de qualidade reforçada com história, cultura, tradição, território | Aumento da oferta e animação da procura com ferramentas de mercado |
| GRANTIA | Pela origem = marca colectiva | Pela marca/empresa |
| CONCENTRAÇÃO EMPRESARIAL | Média-Baixa | Alta |
| MERCADO DOMÉSTICO | Forte e em declínio | Fraco e em crescimento |
| ORIENTAÇÃO PARA A EXPORTAÇÃO | Média | Alta |

Fonte: Adaptado de Barco *et al* (2006, p.7)

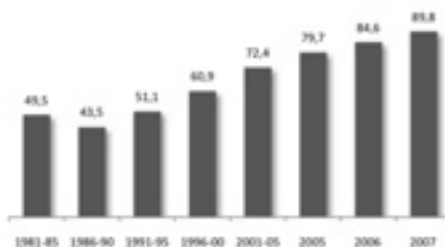
O sector fortemente regulado na União Europeia, através da OCM³, e levemente regulado nos NPP, é também um factor gerador de importantes distorções concorrenciais no plano internacional (Rastoin *et al*, 2006).

³ A OCM do vinho é das mais completas e complexas, regulamentando o sector desde a plantação até ao consumidor. É uma organização comum de mercado (COM), que tem uma forte componente de regulamentação: regulação das plantações, classificação dos vinhos, práticas enológicas, etiquetagem, etc.

Os produtores do Velho Mundo encontram, assim, severos desafios em todos os mercados dos NPP que implementaram sofisticadas e agressivas estratégias de marketing internacional e que continuam a aumentar o seu *output* médio de vinhos de qualidade (Campbell & Guibert, 2006).

Nos dois grandes grupos de países, a par das alterações na oferta e na procura, verificou-se igualmente o aumento do comércio externo (Figura 2) e a intensificação de estratégias de internacionalização, na tentativa de exportar em o excedente da produção que não é absorvido pelo mercado interno (Barco *et al*, 2006).

Figura 2 – Evolução do comércio internacional de vinho (1 000 000 hl)



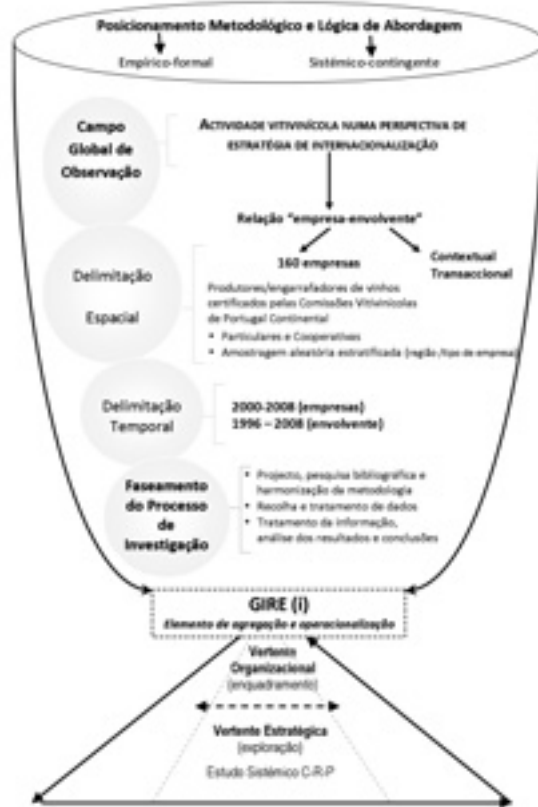
Fonte: Elaboração própria a partir de dados da OIV

Perante este contexto, torna-se relevante analisar o comportamento das empresas vitivinícolas de Portugal, em termos de estruturas organizacionais e de orientação estratégica. Para isso propõe-se uma nova metodologia, direccionada especialmente à abordagem do mercado internacional.

A GRELHA DE ABORDAGEM ESTRATÉGICA - GIRE (i)

A GIRE foi especificamente construída para a abordagem estratégica de empresas do sector vitivinícola em duas regiões específicas – Alentejo e Extremadura espanhola – por António Sousa (2000). Esta assumiu o papel de “pivot” da estrutura metodológica subjacente ao trabalho de investigação desenvolvido pelo autor. Na Figura 3, apresenta-se a adequação da GIRE ao presente trabalho.

Figura 3 – GIRE (i) – Estrutura Metodológica



Fonte: Adaptado de Sousa (2000)

A GIRE (i) passa pela definição das variáveis que, a partir de uma revisão bibliográfica aprofundada sobre o tema, mostram relevância para a compreensão da actividade vitivinícola, numa perspectiva de gestão estratégica da internacionalização.

Os suportes de informação, conforme é salientado por Sousa (2000), baseiam-se numa pesquisa bibliográfica da literatura da especialidade (gestão e vitivinicultura) e numa pesquisa no terreno, propondo combinar a recolha e síntese bibliográfica, a observação directa, o diagnóstico da realidade empresarial e a reflexão criativa, tendente a delimitar

e compreender a problemática em estudo, para sugerir linhas de actuação estratégica capazes de melhorar a competitividade das empresas do sector. A Grelha orienta, assim, o trabalho de investigação para que os objectivos previamente estabelecidos sejam atingidos, estruturando-o em dois níveis de desenvolvimento: um preliminar e outro central (*idem*).

Figura 4 – GIRE (i): agregação de componentes e concretização de objectivos



Fonte: Adaptado de Sousa (2000)

Assim, num nível preliminar de análise caracterizam-se genericamente as empresas em termos de recursos organizacionais, de informação, tecnológicos e comerciais. Num nível central de análise explora-se a vertente estratégica, articulando os três elementos que consubstanciam o denominado estudo sistémico C-R-P: factores contingentes externos e internos (C), tipo de reflexão estratégica (R) e performance económica (P).

A caracterização da dinâmica da envolvente competitiva do sector – factor contingente externo – é feita com recurso ao modelo estrutural das cinco forças competitivas de Porter (envolvente transaccional) e à análise PEST⁴ (envolvente contextual).

Na construção da GIRE, Sousa (2000) identificou quatro factores contingentes internos a partir da revisão de vários estudos de autores de referência no domínio da gestão estratégica: a lógica do empresário, características da actividade, extensão da empresa e qualidade e características dos SI/TI.

No que concerne a Performance, foi identificada como variável a rendibilidade económica, traduzida no indicador ROI.

Na Figura 5, é possível identificar as variáveis que foram consideradas em cada um dos quatro factores contingentes internos referidos, assim como as variáveis e indicadores correspondentes (que figuram igualmente num questionário desenhado especificamente para este fim). Na adaptação da GIRE, incluiu-se, com base nas perspectivas de diversos autores⁵, um factor contingente interno adicional: o «perfil de internacionalização», que engloba a caracterização da forma de entrada e a evolução da actuação da empresa no mercado internacional. Adequou-se igualmente o factor «lógica do empresário» (na tentativa de identificar qual a postura face ao mercado internacional) e o factor «extensão e qualidade» (com o objectivo de caracterizar os produtos exportados).

No que respeita ao «tipo de reflexão estratégica», identificaram-se duas dimensões com base numa revisão da literatura: o «crescimento de internacionalização» e o «grau de internacionalização», resultando quatro tipos de reflexão típicos⁶: «exportação inata»

⁴ Análise das dimensões Política, Económica, Social e Tecnológica.

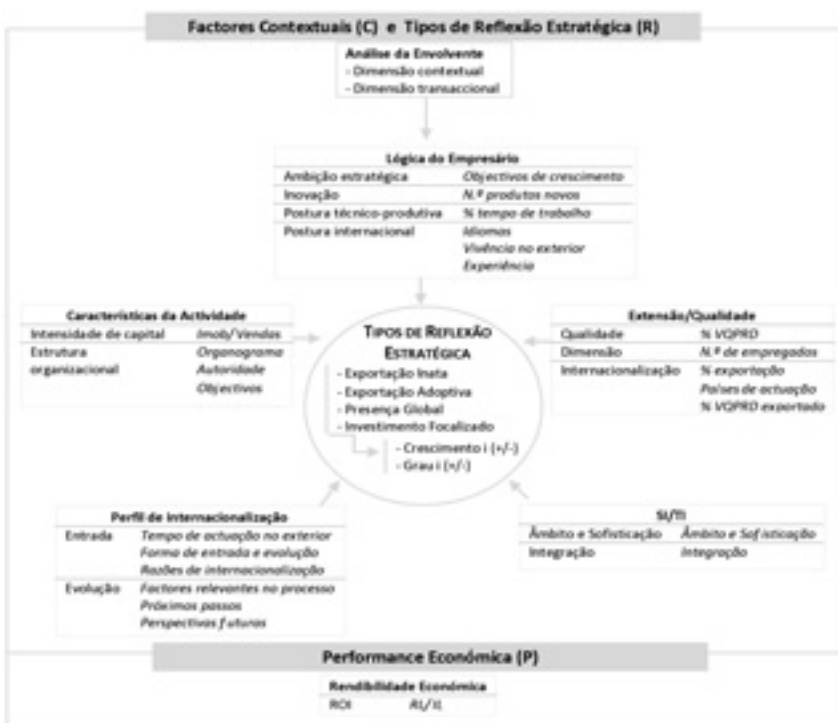
⁵ Czinkota et al (2009), Johanson & Mattsson (1988), Johanson & Vahlne (1977), Johanson & Wiedersheim-Paul (1975), Root (1994) e Sharma & Erramilli (2004).

⁶ De acordo com Oviatt & McDougall (1997).

(crescimento de internacionalização elevado / grau de internacionalização baixo), «exportação adoptiva» (baixo/baixo), «presença global» (elevado/elevado) e «investimento focalizado» (baixo/elevado).

Relativamente à operacionalização deste estudo, a recolha de dados primários será feita pessoalmente, através de implementação de um questionário (previamente testado). O questionário será dirigido aos empresários e/ou gestores/directores gerais das empresas identificadas na amostra (cf. Figura 3). A recolha de dados secundários realiza-se junto de organismos públicos, nomeadamente IVV (Instituto da Vinha e do Vinho), OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho), INE (Instituto Nacional de Estatística) e CVR's (Comissões Vitivinícolas Regionais), entre outros.

Figura 5 – Articulação sistémica C-R-P



Fonte: Adaptado de Sousa (2000)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta reflexão decorre de um projecto de investigação que está em curso, no âmbito de um doutoramento em gestão, pelo que o modelo específico apresentado ainda não foi operacionalizado. No entanto, a base de partida – GIRE - mostra-se um instrumento bastante consistente e fiável (já testado) para poder ser aplicado a um espaço geográfico distinto (Portugal Continental) daquele a que foi já aplicado (Alentejo e Extremadura espanhola) e numa perspectiva diferente: a internacionalização empresarial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barco, E., Navarro, M., & Pinillos, M. (2006). Estrategias de diferenciación versus estrategias de tamaño. El caso de la DOCa Rioja. *Cuadernos de Campo*, 34, 12-16.
- Campbell, G., & Guibert, N. (2006). Old World strategies against New World competition in a globalising wine industry. *British Food Journal*, 108 (4), 233 - 242.
- Czinkota, M., Ronkainen, I., Moffett, M., Marinova, S., & Marinov, M. (2009). *International Business* (European ed.). England: John Wiley.
- Johanson, J., & Mattsson, L. (1988). Internationalization in industrial systems - a network approach. In P. Buckley, & P. Ghauri, *The Internationalization of the Firm: a reader* (pp. 303-321). London: Academic Press.
- Johanson, J., & Vahlne, J.-E. (1977). The international process of the firm - a model of knowledge development and increasing foreign market commitments. *Journal of International Business Studies*, 8 (1), 23-31.
- Johanson, J., & Wiedersheim-Paul, F. (1975). The internationalization of the firma: four swedish cases. *Journal of Management Studies*, 12, 305-322.
- Martin, J.-C. (2007). Terroir et stratégies du négoce dans la filière vitivinicole: une approche historique. In F. Hauteville, J.-P. Couderc, H. Hannin, & E. Montaigne, *Bacchus 2008 - Enjeux, stratégies et pratiques dans la filière vitivinicole* (La Vigne ed., pp. 19 - 36). Paris: Dunod.
- Couderc, H. Hannin, & E. Montaigne, *Bacchus 2006 - Enjeux, stratégies et pratiques dans la filière vitivinicole* (La Vigne ed., pp. 1 - 18). Paris: Dunod.
- Oviatt, B., & McDougall, P. (1997). Challenges for internationalization process theory: the case of

international new ventures. *Management International Review*, 37 (2), 85-99.

Porter, M. (1990). *The Competitive Advantage of Nations*. London: Macmillan.

Rastoin, J.-L., Montaigne, E., & Coelho, A. (2006). Globalisation du marché international du vin et restructuration de l'offre. *INRA Sciences Sociales*, N.º 5-6, Novembro, p. 1-4.

Root, F. (1994). *Entry strategies for international markets* (1st revised and expanded ed.). San Francisco: Jossey-Bass.

Sharma, V., & Erramilli, M. K. (2004). Resource-based explanation of entry mode choice. *Journal of Marketing Theory and Practice*, 12 (1), 1-18.

Sousa, A. (2000). *Estratégias empresariais em contexto dinâmico: lógicas de reorganização das empresas vitivinícolas do Alentejo e da Extremadura face à evolução do Mercado Comum Europeu*. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Gestão de Empresas.

“GREAT CHAIN”: “GREAT QUALITY” - “GREAT ETHICA” OR “META-ETHICAL GREAT” - “META-ETHICAL VITICULTURE GREAT” OR “META-ETHICAL VITICULTURE” OR “GREAT VITICULTURE”.

URGENT NECESSITY TO GO FURTHER TO OR BEYOND THE TECHNICAL, ECONOMICAL AND LANDSCAPE QUALITY PROFIT FOCUSING ON THE “META-ETHICAL VITICULTURE (GREAT)” OR “GREAT VITICULTURE”.

RESEARCH AND VARIOUS CONSIDERATIONS.

GIOVANNI CARGNELLO

RESUMO

(tradução adaptada a partir do original)

Utilizando os modelos de produção de Bellussi, Sylvoz, Guyot e o cordão com talões Royat na “Vini del Piave” DOC (Denominação de Origem Controlada) e apoiando-nos ainda noutras pesquisas foi demonstrado que: 1- a possibilidade de aumentar ao margem de lucro apesar do aumento dos custos de produção total, através do aumento da utilização e aplicação de recursos, incluindo a força de trabalho. 2- a necessidade urgente de distinguir entre os meios e os objectivos e de associar sempre os meios aos objectivos (“Grandes Objectivos”), para além de considerar sempre os benefícios ambientais e sociais em vez de considerar meramente os benefícios técnicos, económicos e a qualidade paisagística ou lucro, criando condições ao longo de toda a cadeia de produção até ao consumidor, de produção sustentável, equitativamente solidária, ou seja “MetaÉtica”.

Palavras-chave: viticultura, grande cadeia, metaética, igualdade, sustentabilidade, solidariedade

Nota do tradutor: optou-se por apresentar a versão original deste artigo, não o traduzindo para a língua portuguesa

¹ Vice President GiESCO; Co-President International Academy of Vine and Wine; Research Director - National Research Centre for Viticulture; Viale 28 Aprile, 26 - 31015 Conegliano (Treviso) (I). **Office:** Phone: +39 0438 456747 – 46 – 45; Mob. +39 349 6614876; Fax: +39 0438 64779; E-mail: giovanni.cargnello@entecra.it; **Personal:** Phone: +39 0438 62128, Mob. +39 347 7191342 ; E-mail: cargnellogiovanni@libero.it

ABSTRACT

Using the Bellussi, Sylvoz, Guyot, and the Royat spur cordon production models in the “Vini del Piave” DOC (denomination of controlled origin) and other researches it has been demonstrated that: 1- the possibility of increasing the firm profit despite the increase in the total production costs through the increase in resources utilization and employment, including the labor force. 2- the urgent necessity of distinguishing between the means and the objectives and to associated always the means to the objectives (“Great Objectives”), furthermore to absolutely consider the environmental and social profit other than considering merely the technical, economical, and landscape quality or profit, existential in the sustainable manner, solidarity equality and furthermore “MetaEthical” following the great supply consumption chain.

Key words: viticulture, great chain, metaethical, equal, sustainable, solidarity

INTRODUCTION

A – A long time ago, in the last century, I passed through a “forma mentis” to sectorial scientific activity, with the only aim to solve technical problems (“SMALL CHAIN”), thus I was using only tools [(such as: quality, mechanization, zonation, training forms, planting distances, cutting systems, manipulation of: terroir and base units of terroir and of terroir (territory): viticultural, enological, economical, socio-environmental, existential, “MetaEthical”, management of: landscape, vineyard, plant (roots, stem, limbs, shoot, canopy), production, products stress, “consumption” and “investment” of soil, territory, world, universe, costs, prices, manual work, enochemical quality, sensorial and other 90 qualities, comprising “Economical Quality” and “Economy of Quality”, environmental study, “zonation”, zone delimitation, use of human and non human resources, alcohol and health, wine and health, water, wine and health, grape maturity (components related to health, sugars, “acids”, polyphenolics, aromatics), etc.], **- to an indispensable “forma mentis” and more interdisciplinary activity, more innovative, “more valid”, guided (as always, at the end should be guided so), to relative objectives of our activity,** and not only of it, following on **“GREAT” OBJECTIVES** the “Great” Chain which from lower to upper are represented of “quality” or “profit”: economical, environmental, social, existential, ethical, in sustainable

solidarity and equal for everything and everyone: “quality” or “profit” “MetaEthical” following the so called methodology of “**GREAT**” **CHAIN**” (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). Since from the beginning, esteemed persons, not only Italian, relative to ethical, moral, philosophical, political, administrative, social, economical, entrepreneurial, scientific, technical worlds, from always involved in this “researches” have admitted and collaborated to this model of working, performing scientific work, doing viticulture, didactics etc. In such sense our contribution is widely recognized, historically and intensified in time (Cargnello G. l.c.; Carbonneau A. et Cargnello G., 2003; Cargnello G. et Carbonneau A., l.c.) For this, I make use of this important meeting (important because organized in the USA, in Davis, in the University where I have made my first steps in professional formation), for honor the insistent invitation from esteemed colleagues to present the following, already presented in a simplified form on the GESCO in Geisenheim (Germany) in 2005 and in Porec (Istria-Croatia) in 2007, but also to underline what I’m writing for a long time: Cargnello G., 1986, 1992, 1994, 1996, 1999, 2003, 2004, 2005, 2006a, 2006b, 2007, 2008 a, 2008 b, 2008 c; Cargnello G., Ferrari A., Forno S., 1988; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). All of it can also be shortened in a wider title of this paper presenting the state of the art of this argument: **QUALITY**”, **ETHICS**”, **ETHICAL VITICULTURE**”, **METAETHICAL**”, **SMALL CHAINS**” (short, super short, medium, mixed, etc.), **“GREAT” CHAIN** from which comes all before written. “Great” in quotations for example: **“GREAT” QUALITY**, **“GREAT” ZONATION**, **“GREAT” ETHICS** or **“GREAT” METAETHICS** due to “Great” Chain or **METAETHICS “GREAT”**, **VITICULTURE METAETHICS “GREAT”** or **VITICULTURE “METAETHICS”** or **“GREAT” VITICULTURE**, **“GREAT” MODE**, **“GREAT”**...: urgent necessity: 1- of semantic intensification and to modernize terms significance (“Great” Semantics), (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). 2- to distinguish the real objectives, (“Great Objectives” according to “Great” Chain), from means used to reach the objectives of our activity, and not only of those, moreover on roles, priorities and “heaviness” of means and objectives priorities (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). 3- to link “always” the means to above mentioned objectives, or at least to the economical one, according to “Great”

Chain, (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). 4- to go finally and innovatively above the technical “quality or profit”, above the classical economic and landscape not starting from the low, or even worst staying on enterprise means and/or profit and starting directly from above and from the maximum, from the higher half and thus from “METAETHICS” according to “Great” Chain, from “METAETHICAL VITICULTURE” or “**GREAT**” **VITICULTURE** always according to “Great” Chain. In our activity we must point directly and immediately to a viticulture, to innovative activity “MetaEthics” according to “Great” Chain, thus to a sustainable activity, solidier and equal for everything and everyone on technical, economical, environmental, social, existential, ethical level. We must therefore point to an activity above and out of sectorial situation and corporative “ethics” joining technical, landscape, economical, environmental, social, existential and ones relative to believes, moral, ethos, different philosophies, politics, fashion etc., because nobody, including men have the right to overpass the other “universe” components, of “Great” Chain: “technical, economical, landscape, environmental, social, existential”, (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). 5- to point on real values (“Great” Values according to “Great” Chain mentioned before and therefore point directly to quality or profit “MetaEthical” according to “Great” Chain) and not point to “Small” Values or means represented of usual technical qualities and/or of classical limited and limiting enterprise profits, (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). 6- to postulate and conduct the activity, giving the adequate, large and uniform answers on 360° with interdisciplinary contribution, technical, economical, socio-environmental, existential, ethical, “Metaethical” interrogatives according to “**GREAT**” **CHAIN** given from the research and from research results users (Cargnello G. 1976, 1986, 1999, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009). It is fundamental to underline again that from the “Great” Chain comes out the most appropriate measure “unit” to apply, which can not be represented for example from mechanization, quantitative and qualitative production (sugars, acids, pH, sensorial grape and wine analyses, etc.), from equipment cost, cost production, gross sell production, singular profits: technical, economical, social, existential, ethical, from “Metaethical” Profit or “**GREAT**” **PROFIT** according to “Great” Chain, as demonstrated by us in the previous paper (Cargnello G. 2005), 7-

to obtain that our viticultural reality together with similar ones (comprising those vitivinicultures where pulverisation and fragmentation of singular estates, of enterprises and of production is present and where other resources like history, culture, monumental etc. internationally estimated are present, as in our circumstances), becomes the motive of richness, of added qualities and answer to all of this, « EX VITE VITA », therefore from vine to life, the real (“Great”) life for men and for universe. As above mentioned, in order to concretize this, measure unit or “GREAT” MEASURE UNIT is represented of “PROFIT OR QUALITY METAETHICS” or “GREAT” PROFIT OR “GREAT” QUALITY, according to “Great” Chain (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007).

8- to link the research to real activity objectives (“Great Objectives) in this case, viticultural. (Cargnello G. 1986, 1999, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007). This researches follow in the chain the former ones, written by myself from the first steps in this activity (more than 500 publications). These activities result as indispensable, also for researches presented in this paper about above mentioned arguments such as: 1- results relative to sectorial researches on technical, economical, environmental, social, existential, ethical, “MetaEthical arguments relative to the choice of: environment, vineyard model, managing of: soil, climate, plant, production and product, 2- numerous technical, economical, socio-environmental, existential, ethical aspects (more than 10000), which have been analyzed in order to extrapolate 54 descriptors of “Great” Chain. Those can be grouped as technical, economical, socio-environmental, existential, ethical, in order to design, realize, conduct and estimate an activity, comprised those viticultural in a “MetaEthical” and innovative way (Cargnello G., 2005, 2006, 2007). 3 – also, and underlined, the specific and fundamental problematic relative to the choice of proper measure unite for the right viticultural model, chosen in an overall of “Metaethical” and not only of this descriptors (Cargnello G. 1976, 1986, 1999, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009).

This is the required introduction, representing the state of the art. Together with the rest of the paper is fundamental and determining for a future of an innovative solidier activity, equal for everything and everybody, thus for an “METAETHICAL” activity, according to “Great” Chain indispensable for the present and for the future of our activity, for humanity and for universe.

This, and I underline, does not mean to lessen the importance of technical-environmental aspects of the present and other events. I wish only to use this occasion to express my point of view, already accepted on international level, and to present “new” visions and priorities: maybe also to honor the insistent invitation from my respectable colleagues.

B – Given those, in this paper I want to present research results from non suspects periods, long before predicted from the methodology of “Great” Chain, which demonstrate facts of which unfortunately only recently everyone became aware, comprising famous economists and politicians, with dramatic notes and economical, social and existential dramatic repercussions. In fact, in the present paper it is demonstrated the possibility to conduct an activity, for example the viticultural one, achieving the increase of “enterprise profit” despite the increase of total production costs through increased resources use, including human labor.

While, because of space limits, we remain only with introduction regarding the necessary need of: a- not mistake for means with objectives b- to join always means and objectives (“Great Objectives”), c- to consider always above “quality or profit” technical economical landscape environmental social existential in a sustainable manner, solidar ed equal and therefore “MethaEtical” according to “Great Chain”, d- to correlate research to real objectives (“Great” Objectives) of activity, in this case viticultural, e- to start from “MetaEthical”, existential, socio-environmental, economical and technical considerations in order to design, realize, manage and estimate a vineyard, viticultural activity, some other our activity etc. and not vice versa.

MATERIALS AND METHODS

These researches have been conducted from 2001 to 2008 on Raboso Piave, (zone DOC “Vini del Piave” – Treviso - I), trained on productive models Bellussi, Sylvoz, Guyot and Royat spur cordon. These researches are referred to normal, medium models and situations, as reported data, which have been supplemented in 2008. Methodology, for space limits is referred to author’s references, in particular to: Cargnello G., 1986, 1996, 1999, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008 a, 2008 b; Cargnello G., Ferrari A., Forno S., 1988; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Results respectively on productive models: Bellussi, Sylvoz, Guyot and Royat spur cordon: grape production (t/hectare) 24.5a (1), 16.0b, 10.5c, 8.0d; grape sugar (Brix): 18.0d, 19.1c, 19.9b, 21.2a; sugar production (t/hectare): 4.410a, 3.056b, 2.090c, 1.696d; grape sensorial analyses (max. 100 points): 73d, 77c, 83b, 92a; human labor (hours/years/hectare): 530, 220, 212, 171; total production grape costs (€/hectare): 8629, 7607, 8597, 8263 e €/t produced grape: 352.2, 475.4, 818.8, 1045.4; grape price (€/t): 450, 495, 590, 649; gross sell price (PLV) (€/hectare): 10329, 7920, 6195, 5192; enterprise profit (€/hectare): +2396, +313, -2402, -3071; enterprise profit (€/t of produced grape): +97.79, +19.56, -228.76, -383.87; “Great Chain”: “quality or profit (max. 100 points): entrepreneurial 79a, 63b, 41c, 34d; landscape: 67d, 76c, 89a, 84b; environmental: 31d, 73c, 89b, 95a; social: 52d, 59c, 67b, 72a; existential: 60d, 89a, 80b, 71c;”MetaEthical”: 58c, 79a, 67b, 49d.

From the research emerges: 1- productive model Bellussi is the one determining higher enterprise profit per hectare and per tons of produced grape despite higher use of resources and human labor 2- productive model Royat Cordon is the one with lo west (very negative) profit (objective) per hectare and per tons of produced grape with higher must sugar quality and the best sensorial grape quality (means), 3- according to “Great Chain” productive model Bellussi is the one determining minor environmental, social, existential, complex, landscape and particularly “MetaEthical”.

Obviously for trasformal viticultural enterprise, economic results, and not only those, could be different and even opposite in function of operative reality and in particular relatively, correspondent to, for example, creation level and creation and valorization of peculiar additional qualities from those traditional characteristic for the enterprise.

Therefore, in order to design, realize, conduct, judge, chose, valorize a productive model, and not only a productive model but also any kind of thing or activity, including the ours, and to skirt non satisfying and/or even wrong research postulation and/or interpretation and/or results communication, with applicative repercussions even catastrophic, it is necessary to go above technical “quality” or “profit”, also to those economical and relative to landscape. Moreover, we must consider urgently environmental, social, existential “quality or profit”, and all of this must be “MetaEthical”, thus

sustainable, solidar and equal according to “Great Chain” for everything and everyone, because as used to say, nobody not even men or any universe component have the right to dominate the others chain components of universe: technical, economical, social, environmental, existential. Consequently, in order to do Viticulture, (with **V** in capital and bold), we must point immediately and without unacceptable and excuses, at least on mental and basic setting, on “MetaEthics”, on “Metaethical Viticulture” or “Great” Viticulture according to “Great Chain”.

Therefore it has be underlined that we should not stop on quality or technical profit (mean) or at those of enterprise, landscape, biological etc., while we must necessary and urgently go further pointing to “METAETHICAL VITICULTURE” or “GREAT” VITICULTURE according to “GREAT CHAIN”. (Lc: Cargnello G., 1986, 1992, 1994, 1996, 1999, 2003, 2004, 2005, 2006a, 2006b, 2007, 2008 a, 2008 b, 2008 c; Cargnello G. et Carbonneau A., 2007).

Hence, in order to present viticultural models capable to collect all advantages without deficiencies of Bellussi, Sylvoz, Guyot, Royat spur cordon and other “traditional” and thus globally better that other productive models and trying to approach to “MetaEthical Viticulture” or “Great” Viticulture, interesting research are going on “new” global productive models such as VTMP (Vertical Tridimensional Minimal Pruning), Sylvoz Moderno, Albese, NiofCasarsa and Conegliano Spur Cordon.

Date signed with the same letter are not different between them, while those signed with different letters are different at $p \leq 0,05$ with test of Duncan.

CONCLUSIONS

From this paper started more than 20 years ago and performed on Raboso Piave (zone DOC “Vini del Piave”) from 2001 to 2008 utilizing productive models Bellussi, Sylvoz, Guyot and Royat spur cordon, in accordance to what predicted by “Great” Chain emerged: 1- the possibility to increase enterprise profit in spite of increasing total production costs through the increase of resources including human labor, 2- productivity model with highest must “quality” (sugar quality and sensorial (means) gave minor (very negative) enterprise profit (objective), 3 – productive model with the most positive enterprise profit (very high), have registered the most negative and/or unacceptable profit: “environmental”, social, existential, complex and “MetaEthical” according to “Great Chain”, 4- undeferrable necessity to: a) deepen actual knowledge about semantic and actual significance of terms ex. relative to means and objectives (“Great” Objectives according to “Great” Chain illustrated in the text, b) necessarily and urgently link objectives and means utilize to obtain those objectives, 5 – point the interest of researches to “new-old” productive models which better than Bellussi, Sylvoz, Guyot and than Royat spur cordon can get closer to ideal model represented to one denominated: “Great” Viticulture according to “Great” Chain. With this aim, researches on promising “new” global productive models such as VTMP (Vertical Tridimensional Minimal Pruning), Sylvoz Moderno, Albese, il NiofCasarsa and Conegliano Spur Cordon are in final research faze, 6- urgent necessity to go further technical, economical, landscape “quality or profit” considering also those “environmental”, social, existential and all of it must be sustainable, solidar, harmonic and equal for everything and everyone, and thus “MetaEthical” according to “Great” Chain. Therefore in real time and in that sense it is suitable and undeferrable to operate, conduct researches and explain its results in a world, with all reasons every day more global.

Therefore we hope strongly that this paper could contribute to realize better and on time, this ambitious but realistic objective, thus to realize better a new “GREAT” RESEARCH indispensable for realization of “GREAT” ACTIVITY or “METAETHICAL ACTIVITY”, to realize better in this specific case the so called “METAETHICAL VITICULTURE” or “GREAT” VITICULTURE according to “Great” Chain, and not only this !

Acknowledgments: Thanks to dr. Barbara Sladonja for precious help.

LITERATURE :

- CARGNELLO G. (1986): Recherches de nouveaux systèmes de conduite pour une viticulture économique et de qualité dans le Nord de l'Italie. Thèse de Doctorat. ENSAM - Montpellier (France), pp. 1-332.
- CARGNELLO G., FERRARIS A., FORNO S. (1988): Costi di produzione e di allevamento della vite. *Terra e Vita*, 42, pp. 66-72.
- CARGNELLO G. (1992): Economic and social aspects concerning new training and viticulture systems in "cold" italian environments. Acts 3rd International Cool Climate Symposium, F.A. Geisenheim, Mainz (Germany), 12-14/06, pp 1-6.
- CARGNELLO G. (1994): Social and economic aspects concerning new models of an increasingly profitable viticulture in researches on "global reasoned viticulture". XXIV International Horticultural Congress, Kyoto (Japan). pp 1-10.
- CARGNELLO G. (1996): La qualité économique, l'économie de la qualité et la qualité économique des préférences: différentes considérations. *Compte-rendu n° 9 GESCO*, Budapest (Hongrie), 21-23 Août, pp. 379-384.
- CARGNELLO G. (1999): Evaluation "globale" de processus productifs, d'aspects techniques et scientifiques divers, etc ... : considérations générales relatives à la grande filière viti-vinicole. *GESCO Sicilie*, Italie, 6-12 June, pp. 362-371.
- CARGNELLO G. avec la collaboration de Luciano Pezza et de Teresa Camatta. (2003): Evaluation globale (technique, scientifique, économique, sociale, existentielle, qualité de la vie...etc.) des modèles productifs: aspects méthodologiques actuels. *Compte Rendu n° 13 GESCO Montevideo* (Uruguay), 3-8 febrero, pp. 38-40.
- CARGNELLO G. (2004): Modelli vitivinicoli "globali" per produrre in Lazio vini tipici originali innovativi di qualità economica sociale esistenziale nonché di lettura, di promozione e di sviluppo del territorio: aspetti viticoli. *Atti del convegno su "La ricerca viticola ed enologica: opportunità di sviluppo e promozione del territorio"*, Velletri 17 dicembre, pp. 24-3.
- CARGNELLO G.. (2005): Les "qualités" et la viticulture éthique équitable soutenable solidaire. *Recherches, considérations diverses et applications pratiques. Proceedings Vol. 2 XIVth International Symposium GESCO*, Geisenheim, 23-27 August, pp. 787-798.
- CARGNELLO G. (2006a): "Ethical Wine e Food e Farming e Living...": ricerche pluriannuali e considerazioni varie. *Taste Vin*, 2, pp. 15-18. CARGNELLO G. (2006b): Ricerche e riflessioni

- varie su quale/i viticoltura/e adottare e su quale/i indice/i impiegare per una sua/loro valutazione settoriale e/o globale tecnica economica sociale esistenziale etica. I° Convegno Nazionale di Viticoltura, Ancona 21-23 Giugno, pp. 1-18.
- CARGNELLO G. et CARBONNEAU A. (2007): Méthode de la “Grande Filière” appliquée au management d’un modèle productif de vignoble. Proceedings XVth International Symposium GESCO Porec - Croatia 20-23 June, pp. 16-33.
- CARGNELLO G. (2008b): L’universalità “Etica e MetaEtica” secondo la “Grande Filiera” (GF) delle produzioni come elemento equilibratore base tra unicità e uniformità del mosaico paesistico produttivo internazionale e del WTO. XIII Convegno internazionale interdisciplinare: Unicity, Uniformity and Universality in the Identification of the Landscape and Cultural Mosaic, Aquileia (UD) 17-18 settembre pp. 4-9.
- CARGNELLO G. (2008c): Nuove innovative filiere produttive: Corta, Super Corta e Grandi. Urgente necessità di concretare la “GRANDE FILIERA SUPER CORTA”. TASTE VIN 5 pp. 24-29.
- CARGNELLO G. (2009): Urgente necessità di approfondimenti semantici ed “etici”. Innovazione, sostenibilità, mode, emozioni, salute, produzioni, “metaetica” e filiere in viticoltura. Taste-Vin, n° 1 pp. 62-63.
- CARGNELLO G. (2009): Recenti originali contributi per l’innovazione e il progresso tecnico, socio-economico ed etico del settore vitivinicolo. Taste-Vin, n° 2 pp. 63-67.
- CARGNELLO G., PERSURIC G., MILOTIC A. (2009): Our original innovative and productive models also for Croatia. 32 nd World congress of vine and wine 7 th general assembly of the O.I.V. Zagreb, Croatia, 28 June 3 July.
- BOATTO V., GALLETTO L., SCAGGIANTE S., TEO G., BARISAN L., CARGNELLO G., PEZZA L., GALLO G., DI GAETANO R., CAMATTA Teresa, BONGHI C., BIANCHINI Federica, VEILLEUX Lissa, NEGRO V, †CURTOLO C., PANCOT M., CECCHETTO G. (2009): Research in the technical, socio-economical, and ethical aspects for Veneto vitiviniculture (north est Italy). 16 th International Symposium GIESCO 2009 Uc-Davis (USA - CA). pp. 283-287.
- CARGNELLO G., BAZZOFFI P., BUCELLI P. (2009): “Rural districts”: the productive “units” which determin the products typicity, originality and “metaethical” affirmation. 16 th International Symposium GIESCO 2009 Uc-Davis (USA - CA). pp. 605.
- CARGNELLO G., PEZZA L., GALLO G., DI GAETANO R., CASADEI G., CINTONI C., MO-

- RETTI Simonetta, ALBANESE A., COMANDINI Maria Cristina, RUGINI E., BOATTO V., SCAGGIANTE S., TEO G., BONGHI C., BARISAN L., VEILLEUX Lissa (2009): Viticultural and economic-social-metaethical researches in the “cordon spur of Conegliano” and in the “vertical tridimensional minimal pruning of Conegliano” (VTMPC) with and without DMRps (“Doppia Maturazione Ragionata - passerillage sur souche - Double Reasoned Maturation of Conegliano”). 16 th International Symposium GIESCO 2009 Uc-Davis (USA - CA). pp. 311-315.
- CARGNELLO G. (2010): “Metaethik” oder “grosse” ethik gemaess des “grossen produktionsverlaufes” zu einem innovativen nachhaltigen impakt (“grosse innovative nachhaltigkeit”) auf die produktion – qualitaet – kommunikation – marketing und verwendung des erzeugnisses and rural districts. International IVIF (InterVItis interFructa) Congress, 24-28-03 Stuttgart (D).
- CARGNELLO G. (2010): VTMP (Vertical Tridimensional Minimal Pruning), minimum pruning, minimal pruning, R5000C, R6000C ed R10000C: alt-neue interessante integrierte produktionsmodelle zu einem innovativen weinbau. International IVIF (InterVItis interFructa) Congress, 24-28-03 Stuttgart (D).
- CARGNELLO G., DI GAETANO R., DI GAETANO S., PEZZA L., GALLO G., CARGNELLO Elena, TEO G., VEILLEUX Lissa (2010): Proposte di sviluppo “eticamente” sostenibile ed esempi di successo della viticoltura di montagna e/o in forte pendenza della Sicilia Sud Orientale dal punto di vista tecnico, economico, ambientale, sociale, esistenziale, etico, culturale e “turistico relazionale”. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viteicoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.
- DI GAETANO R., CARGNELLO G., DE MARCO A., SERGES T., LIA P., TUMINELLO G. (2010): Contributo del “Progetto della Sicilia sud orientale - VISPEI” allo sviluppo sostenibile della viticoltura di montagna e/o in forte pendenza e/o terrazzata. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viteicoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.
- CARGNELLO G., DI GAETANO R. (2010): Contributo del “Progetto Giarratana-Monti Iblei” (RG) allo sviluppo sostenibile della viticoltura di montagna ed in forte pendenza della Sicilia Sud Orientale. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viteicoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.

- CARGNELLO G., BAZZOFFI P., DI GAETANO R., BOATTO V., GALLETTO L., CIOLFI G., SPERA G., CASADEI G., †CURTOLO C. (2010): Aspetti positivi e opportunità di sviluppo della viticoltura di montagna ed in forte pendenza dei monti Iblei (RG) (I) dal punto di vista: tecnico, economico, socio-ambientale, esistenziale, etico, culturale, turistico. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viticoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.
- CARGNELLO G., BAZZOFFI P., PEZZA L., BELFIORE N., GALLO G., BOATTO V., TEO G. (2010): Ricerche sull'applicazione delle norme di condizionalità per la conservazione dei terrazzamenti e dei ciglionamenti dei terreni vitati di montagna e/o in forte pendenza. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viticoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.
- CARGNELLO G., BAZZOFFI P., PEZZA L., BELFIORE N., GALLO G., TEO G., DI GAETANO R. (2010): Ricerche sulle norme di condizionalità per la sostenibile conservazione dei terrazzamenti e dei ciglionamenti dei terreni vitati di montagna e/o in forte pendenza. CERVIM – III Congresso Internazionale sulla Viticoltura di montagna e in forte pendenza, 12-14 maggio, Castiglione di Sicilia (I). In literis.
- CARBONNEAU A., CARGNELLO G., OJEDA H., TONIETTO J., SCHULTZ H. (2010): Synthesis of the contribution of the GIESCO (Group of international Experts of vitivincultural Systems for CoOperation) to the study of terroirs. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- BOATTO V., GALLETTO L., SCAGGIANTE S., TEO G., BARISAN L., GIULIVO C., PITACCO A., BONGHI C., CARGNELLO G., PEZZA L., GALLO G., MORETTI Simonetta, CASADEI G. (2010): Il vigneto, i cambiamenti climatici, l'ambiente, la scelta del genotipo e la "grande filiera" per la valorizzazione sostenibile del settore vitivinicolo con particolare riguardo all'export extra unione europea. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G. (2010): Innovative zonazioni e valorizzazione dei prodotti tipici e originali del "Piave". VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G., SPERA G., PEZZA L., GALLO G., DI GAETANO R., FLORIANI L., DASSIÉ M. (2010): Il contributo della "Grande Filiera" per una sostenibile zonazione ("Grande Zonazione") delle "terre da vino". VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.

- CARGNELLO G. (2010): Terroir, unité de terroir e de territoire, terroir, ambiente, “terra”, zonazione e “Grande Zonazione”. ricerche e considerazioni varie. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- BOATTO V., GALLETTO L., BONGHI C., SCAGGIANTE S., TEO G., BARISAN L., CARGNELLO G., PEZZA L., GALLO G., MORETTI Simonetta, CASADEI G. (2010): Produzioni da varietà e aree viticole storiche del mondo: problemi e prospettive. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G., MORETTI Simonetta (2010): Il paesaggio ed il suo immaginario e qualità dell’uva e del vino. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G. (2010): Il vigneto e l’ambiente: il vigneto quale mezzo per massimizzare il valore dell’ambiente, del territorio e delle terre da vino. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G. (2010): Tecniche colturali e l’ambiente: analisi delle tecniche colturali per una sempre migliore valorizzazione dell’ambiente, del territorio e delle terre da vino. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G., SPERA G., BONGHI C. (2010): Gestione della produzione e l’ambiente: la gestione della produzione per rendere massimo il valore dell’ambiente, del territorio e delle terre da vino. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G., SPERA G. (2010): Il vigneto e la sua sostenibilità ambientale: le varie sostenibilità ambientali del vigneto. VIII International terroir congress 14-18 June, Soave - (VR) Italy. In literis.
- CARGNELLO G., TEO G., BASSOTTO F., DI GAETANO R., FORNO S. (2010): Guaranteeing farm profit while maintaining or increasing both personnel and resource use. XXXIII congresso mondiale della vigna e del vino – ottava assemblea generale dell’OIV, 20-27 Giugno, Tbilisi (Georgia). In literis.
- CARGNELLO G. (2010): Innovative and sustainable winegrowing techniques related to OCM, new challenges, new products and ethics. XXXIII congresso mondiale della vigna e del vino – ottava assemblea generale dell’OIV, 20-27 Giugno, Tbilisi (Georgia). In literis.
- CARGNELLO G. (2010): Contributo di base finale della nostra filiera CONAVI 2006 – 2008 - 2010. Un esempio concreto di attività che va oltre la “qualità - profitto” tecnico ed “economico

d'impresa" per una viticoltura "etica" e "metaetica" o "grande" viticoltura. CONAVI – III Convegno Nazionale di Viticoltura 5-9 Luglio S. Michele all'Adige (TN). In literis.

TEO G., CARGNELLO G., BOATTO V., GIULIVO C., PITACCO A., BONGHI C., GALLETTO L., SCAGGIANTE S., BARISAN L., VEILLEUX Lissa, DI GAETANO R., PEZZA L., GALLO G., BELFIORE N., CAMATTA Teresa, PANCOT M., CECCHETTO G. (2010): Ricerche socio-economiche e tecniche relative al controllo quantitativo e qualitativo della produzione in pre e post-hrvest: "Doppia Maturazione Ragionata", vendemmia normale e tardiva, appassimenti naturali e forzati. CONAVI – III Convegno Nazionale di Viticoltura 5-9 Luglio S. Michele all'Adige (TN). In literis.



A IMPORTÂNCIA DA MARCA PORTUGAL E DA MARCA REGIÃO DE VINHOS NA INTERNACIONALIZAÇÃO DE UM PRODUTOR

Mário CRAVIDÃO; Duarte XARA BRASIL¹

RESUMO

A Gestão da Marca aplicada ao vinho deve tomar em consideração não só a Marca Produto mas também a Marca Região e a Marca Nação. Para criarem valor, estas duas últimas devem ser geridas a nível internacional com tanto rigor como a própria Marca do vinho. Num momento em que se discute a importância da Marca Portugal no sector do vinho e perante as oportunidades criadas pela reforma comunitária com a Organização Comum do Mercado, Portugal precisa de se afirmar em relação a outros países do “Velho Mundo” e do “Novo Mundo” que são particularmente agressivos na criação de Marcas Região e Nação. Analisando o que tem vindo a ser feito na Gestão da Marca em duas regiões líderes de mercado nos seus países e em franco crescimento internacional, casos da Rioja em Espanha e da Califórnia nos EUA, retiram-se um conjunto de ensinamentos que podem fazer sentido à fileira de vinho nacional.

Palavras-Chave: Marca Nação, Marca Região, Marketing, Internacionalização, Vinho

1. AS MARCAS NAÇÃO E REGIÃO

1.1. Enquadramento à Marca Nação, País de Origem e Marca Região

A Marca é um elemento fundamental para criar não só uma identificação que se quer única mas simultaneamente uma diferenciação conforme defende AAKER (1994) perante aquilo que é a sua concorrência. Em particular na internacionalização, além da Marca Produto (e Produtor) devem ser simultaneamente tomadas em consideração a Marca Região e a própria Marca Nação pois qualquer uma delas poderá ser uma fonte de maior ou menor valor para a própria Marca Produto. Um dos fenómenos recentes a que temos vindo a assistir é o desenvolvimento da imagem de Marca que se prolonga para além do Produto para entidades Supra-Regionais (como exemplo a Europa), Países,

¹ ESCE, Campus do Instituto Politécnico de Setúbal, Estefanilha, 2914-503 Setúbal Portugal;
mario.cravidao@esce.ips.pt ; duarte.brasil@esce.ips.pt

Regiões e Inter-regionais e Cidades. Segundo VALLS (1992) este fenómeno é uma consequência da internacionalização das economias, mas também de uma comunicação de Produtos, Serviços e Ideias, assente numa “audio-visualização universal” com capacidade de impressionar à distância para a promoção das economias. Os Países e Regiões competem internacionalmente pela captação de investimento externo, desenvolvimento do Turismo e da Moda, captação de talentos, mas em particular pelo fomento das Exportações. Existe assim uma preocupação no desenvolvimento de uma Imagem de Marca de uma Região para uma identificação mundial e subsequentemente criação de vantagens competitivas. A terminologia associada a esta nova problemática que se cruza com a Marca Nação ou Marca País, País de Origem (*Country of Origin*), Marca Região, Marca Cidade, Marca Local – (*Place Branding*), tem um âmbito que se aplica às Nações, Regiões e Cidades como um “*continuum*” (DINNIE, 2008) da Marca do Produto, Serviço e Organização. No entanto, a teoria da Marca do Produto deve ser adaptada à Marca Nação. Existem maiores dificuldades nesta adaptação pois a sua imagem pode ser afectada por estereótipos difíceis de mudar e a sua gestão é sempre um processo de construção a longo prazo. Têm em comum o facto de terem uma natureza multidimensional e de se dirigirem a múltiplos grupos (*stakeholders*) que poderão ser turistas, potenciais investidores, empregados, estudantes ou consumidores nacionais e internacionais.

Entende-se por Marca Nação a “combinação única e multi-dimensional de elementos que providenciam à Nação uma diferenciação enraizada culturalmente e relevante para todas as suas audiências alvo” DINNIE (2008: 15). ANHOLT (2007) fala mesmo da necessidade de se ir mais além do que a consideração comercial da Marca colocando-a ao nível da Política Nacional. A Marca Local deve ser relacionada com a Identidade Nacional, Política e Competitividade num caminho para se criar uma Identidade Competitiva.

1.2. Identidade e Imagem da Marca Nação

O desenvolvimento da Identidade da Marca Nação de acordo MARTIN ROLE citado por DINNIE (2008) passa, à semelhança das Marcas Produto/Organizações pela definição da Visão da Marca (*Brand Vision*- o que espera alcançar), do Alcance da Marca (*Brand Scope* – segmentos de mercado e categorias de produtos da Marca Nação), do Posicionamento da Marca (*Brand Positioning*- o lugar que pretende ocupar na mente

dos consumidores), da Personalidade da Marca (*Brand Personality*- carácter pessoal da Marca que pode ajudar o consumidor a ligar-se emocionalmente com a mesma) e da Essência da Marca (*Brand Essence* - o que a representa e torna realmente única). Ao contrário das Marcas de Produtos e Serviço e em função da “infinita riqueza cultural” nas Marcas Nações, para DINNIE (2008: 43), é difícil definir uma Essência em poucas palavras correndo-se o “dilema da encapsulação”. A Identidade das Marcas Nação deve ser inspirada na Identidade Nacional. Desta devem ser seleccionados elementos chave que possam ser comunicados com base na história, cultura, ideologia e códigos de expressão como a linguagem, ícones e bandeira nacional. A Imagem da Marca Nação, segundo JAFFE e NEBEN ZAHL citado por DINNIE (2008: 47), deve ser entendida como “o impacto que generalizações e a percepção sobre um país pode ter na avaliação dos produtos e/ou marcas do país.”

1.3. O Capital da Marca Nação

Numa perspectiva do consumidor e à semelhança das Marcas Produto, devem ser entendidas como fontes do Capital da Marca Nação: a notoriedade, as suas associações únicas, a qualidade percebida e a fidelização. O Capital da Marca Nação pode também estar associado aos elementos descritivos da Marca (inspirados na sua Identidade Nacional) e imaginários, mas também às associações e percepções dos consumidores.

Numa perspectiva financeira, ANHOLT (2007) desenvolveu um Índice das Marcas nacionais mais valiosas como forma de medir a sua contribuição para a economia. A Marca Portugal aparecia apenas no 20º lugar e com um valor de 189 biliões de USD. O mesmo conceito foi depois desenvolvido para as Marcas Cidade. Lisboa nem outra cidade portuguesa apareciam evidenciadas nas primeiras 30 cidades do estudo.

São considerados para SIMON (2007) fontes e dimensões de valor da Marca Nação, Activos Internos (a Iconografia, Paisagem, Cultura, Adesão nacional, Apoio às Artes, Níveis de Fidelização) ou Activos Externos (“Embaixadores” da Marca, a Diáspora, as Marcas exportadas, as percepções da Imagem do País, o retrato externo da cultura popular).

1.4. A Construção da Marca Nação

Para AAKER (1994) um projecto Construção de Marca - *Brand Building* é um processo fundamental que envolve elementos estratégicos, pesquisa, design e que passa pela criação do nome, identificação de uma identidade visual, definição de posicionamento e a gestão do Capital da Marca. Não existe, quer para OLLINS (2003) como para DINNIE (2008) um modelo estratégico a replicar para a criação de uma Marca Nação. Mas todo o processo deve começar com a análise estratégica interna, análise estratégica externa, planeamento estratégico e implementação estratégica.

São considerados elementos fundamentais da operacionalização da Marca Nação a Publicidade da Marca Nação, a Gestão de Relacionamento com Clientes das várias audiências, a mobilização da Diáspora, a criação de Dias da Nação (criando orgulho fora e dentro do país), uma boa Arquitectura da Marca Nação que evite confusões, a avaliação do desempenho através de estudos de *tracking*. A própria música pode ser utilizada no sentido de se criar uma atitude positiva para a compra de um vinho de um determinado país.

1.5. As especificidades da Marca Nação, País de Origem e Marca Região no Vinho

A aplicação do País de Origem ao vinho foi estudada no Reino Unido e na Nova Zelândia concluindo-se da sua influência nas avaliações do consumidor e no facto de despertar um processo de avaliação bastante complexo – HAMLIN (2006). Do mesmo modo, JONHSON *et al.* (2007) estudou a importância da Região de Origem do Vinho nos EUA tendo concluído que 85% dos compradores indicaram a região como sendo analisada quando avaliam um rótulo de vinho, sendo assim, um elemento muito importante na decisão de compra e mais relevante que a Marca e Ano. Resultados que salientam a importância da Região de Origem na avaliação do vinho foram igualmente conduzidos em Portugal com RIBEIRO *et al.* (2008) e YON (2003). Existe no entanto uma grande diferença entre o “Velho Mundo” e o “Novo Mundo” com o terroir (combinação tripartida de casta, clima e solo) sendo muito mais utilizada e valorizada nos países europeus (“Velho Mundo”) como argumento de venda. Uma Marca Região tende a superar a avaliação cognitiva pois adiciona um lado emocional inerente à origem do produto. As percepções, as atitudes e também o sabor são afectados pelas Marcas e o

nome anglófono e francófono que possam adoptar (LECLERC citado por ORTH *et al.* 2005).

Na competição internacional do vinho, em que a mensagem da qualidade enquanto argumento de venda se encontra saturada, o capital que se possa acrescentar à Marca pela Região de origem de vinho, vai possibilitar que se evite a mudança entre vinhos e que a competição não se faça exclusivamente com base no preço. As imagens das Regiões são poderosos estereótipos que influenciam comportamentos de compra.

De acordo com ORTH *et al.* (2005) as regiões de vinho enquanto Marca *Umbrella* devem ser criadas em função de cinco dimensões: benefícios funcionais e uma qualidade consistente no vinho, boa relação preço / qualidade, benefícios sociais e de bem-estar como o prazer e felicidade, benefícios ambientais (sem poluição) ou humanos (por ritos) e benefícios emocionais. Estas dimensões têm impacto ao nível da construção da Marca, selecção de audiências alvo e na definição das mensagens chave de Marketing.

A Marca Região será também um factor determinante na compra do vinho, tanto quanto mais recente for o projecto de um determinado produtor, que ainda necessita de tempo para consolidar a sua notoriedade e imagem enquanto Marca Produtor e Marca Vinho.

2. BENCHMARKETING NO VINHO – MARCAS REGIÃO

2.1. A Região da Rioja e o Vinho

La Rioja é uma região de vinho de Espanha localizada a sul das montanhas do Cantábrico que produz um vinho DOC Rioja. O carácter distintivo dos vinhos da Rioja advém do envelhecimento do vinho em cascos de carvalho, que se traduz num sabor a baunilha nos vinhos. Segundo o CONSEJO REGULADOR (2008), no espaço de uma década as vendas totais subiram de 2.222 mil hectolitros para 2.519 mil hectolitros, nos quais o mercado interno subiu para os 1.719,9 mil hectolitros (de 1.506,8 em 1998), onde lidera com uma Quota de Mercado próxima dos 40%, e o exterior para 799 mil hectolitros (de 715,5 em 1998). Em 2008 o principal mercado de exportação foi o do Reino Unido com 36% do total, seguido da Alemanha 17%, EUA 8,7% e Suíça 7,8%.

2.1.1 A Estratégia, a Gestão da Marca e o Plano de Comunicação

Num Plano Estratégico até 2020 criado pelo CONSEJO REGULADOR (2007) estabeleceu-se como prioridade o aumento dos investimentos promocionais em mercados chave, a flexibilização da produção com a introdução de novas castas que possibilitem a adaptação de vinhos aos mercados, o desenvolvimento da qualidade (contendo rendimentos de produção por hectare) e o desenvolvimento do enoturismo. Os objectivos da comunicação e estratégias seguidas visam não só passar uma imagem de qualidade, diversificação e inovação mas também por aumentar a reputação da Rioja nos consumidores, expressando as suas características singulares, bem como uma imagem moderna e atractiva junto dos consumidores mais jovens. Existiu também uma preocupação em avaliar o *Brand Equity* da Rioja, chegando-se à conclusão que o seu principal desafio passava pela consolidação da notoriedade da Marca e da imagem de Marca da Rioja para consumidores e prescritores, demonstrando a evolução dos novos estilos de vinhos que variam dos mais tradicionais aos mais modernos.

A Rioja tem um Plano de Comunicação ajustado por país, construído em conjunto com agências de Relações Públicas desses mercados e com uma *Brand Identity* que se quer diferenciada (por exemplo para os EUA, desenvolveu-se uma campanha denominada “Rioja Vibrante” com o objectivo de transmitir aos consumidores uma posicionamento da Marca Rioja associada à paixão que deriva da experiência dos vinhos da região e da sua evolução). Tem grupos alvo profissionais e de consumidores bem definidos e concentra os seus recursos para fazer Planos de Comunicação que abrangem um *mix* bastante integrado, passando por relações públicas, patrocínios (como exemplo do *New York Fashion Week*, o maior festival de moda nos EUA), promoções e acções no ponto de venda (por exemplo as acções concertadas de descontos promocionais nos retalhistas de Nova Iorque, com os quais fizeram degustações e acompanhadas de patrocínios a eventos de Marcas de cosméticos e da American Express). Pretende-se criar um *Brand Equity* alicerçado a uma nova Rioja, estando dispostos a apresentar, para além do carácter diferenciador dos seus vinhos, uma capacidade de adaptá-los aos mercados. Irá reforçar o orçamento (aproveitando a OCM), concentrando o investimento por questões de eficácia e investir 11 milhões de euros para a internacionalização em apenas três países: EUA, México e Suíça. Independentemente das iniciativas agregadas com o ICEX e com a gestão que faz da Marca Nação Vinhos de Espanha, as suas iniciativas individuais são

assim determinantes para criar um capital e identidade própria em torno da Marca Rioja. O esforço de comunicação foi reconhecido nos EUA pela prestigiada revista de vinhos americana *Wine Enthusiast* em 2007, que a elegeu como a melhor região de vinhos do ano pela sua revolução de estilo (reconhecendo também a sua capacidade para adaptar os vinhos ao gosto americano).

2.2. A Marca “Nação” Califórnia

As vinhas na Califórnia representam aproximadamente 230 mil hectares dos quais *Napa Valley* (“terra da fartura” na original terminologia índia nativa) é a mais famosa. De acordo com o *Wine Institute* as exportações de vinho dos EUA em 2008, atingiram os 4.910 mil hl (+8% que em 2007) e um valor de mais de 1 bilião de USD (+6% que em 2007). A Califórnia representa só de *per si* aproximadamente 90% desse valor. Metade deste valor destina-se à Europa (496 milhões USD), que é o principal mercado de destino, seguido do Canadá, Japão, Hong-Kong e México. O vinho tem um grande papel no desenvolvimento económico já que é o segundo produto em valor em termos de exportação na Califórnia.

2.2.1. A Estratégia e o Plano de Comunicação da Califórnia

A Califórnia é um Estado que representa a bem sucedida internacionalização dos vinhos dos EUA. Tem uma dimensão e recursos sem igual na Europa, gerindo inclusive um programa de internacionalização (*Market Access Program*) que pode custear totalmente as despesas das suas Adeegas. É evidente a preocupação em alargar a internacionalização para o maior número de mercados (28 países). O *Wine Institute*, associação que agrega as adeegas da região definiu como grupos alvo do Plano de Comunicação os media e os distribuidores internacionais, os quais se pretendem formar sobre a qualidade e variedade do vinho da Califórnia. A Imagem da Marca Califórnia segundo CRAVIDÃO (2009) quer estar associada: à gastronomia (“Califórnia Terra de Comida e de Vinho”) e que é exemplarmente comunicado nas maiores feiras internacionais², ao

² No Stand da Califórnia na *Prowein* de 2009, Chefes de cozinha confeccionavam num espaço devidamente equipado, pequenos pratos para degustação com os vinhos

turismo e à apreciação das boas coisas da vida (como a Revista “*California Find Yourself Here*” - editada pelo Turismo da Califórnia e distribuída nas feiras internacionais), a um certo estilo de vida pelo que explora a imagem de personalidades como a do seu Governador Arnold Schwarzenegger, ao sol que se traduz em vinhos singulares e que está presente no logótipo dos vinhos da Califórnia e no *slogan* “Inspirado pela Vida”. Aproveita-se sustentadamente de uma série de sinergias entre os sectores político, de turismo e vinho numa tentativa de criar um *Brand Identity* único e diferenciador. Existe também uma preocupação evidente em analisar a posição competitiva perante outros concorrentes e em particular o Capital da Marca ao nível da notoriedade, imagem e a taxa de experimentação / consumo em vários mercados chave. A GFK (2007) no mercado da Alemanha, concluiu que a Califórnia é uma marca forte comparativamente ao nível da notoriedade espontânea dos países produtores de vinho (5ª Marca mais forte com 18% de notoriedade espontânea, aparecendo à frente de países mais próximos geograficamente como Portugal com 12%).

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Quer o Instituto do Vinho e da Vinha, a Viniportugal como as Comissões Vitivinícolas Regionais das várias regiões que fazem a promoção da nova Marca Portugal (*Wines of Portugal*) e das Marcas Região respectivamente, têm que procurar estar alinhadas na estratégia (por exemplo evitando a dispersão de mercados alvo), bem como, nos seus Planos de Promoção / Comunicação para diminuir o impacto da sua pequena dimensão em termos de orçamentos de Marketing. A necessidade de procurar sinergias tem que ir para além do vinho e ser politicamente mais ambiciosa. A aliança com o Turismo é fundamental para que o orçamento ganhe uma outra dimensão, mas também para que a arquitectura da Marca Portugal, a sua identidade e imagem sejam devidamente estruturadas. É determinante igualmente criar uma rede própria de representantes internacionais do vinho como têm a Rioja ou a Califórnia. A valorização da diáspora como primeira porta de entrada em mercados como os EUA / Canadá ou das ligações históricas e culturais com Angola e Brasil são também fundamentais para se ser bem sucedido na construção e gestão da Marca. A Marca Portugal (como a nova *Wines of Portugal*) e a

Marca Região devem acrescentar valor para os agentes económicos e ajudá-los na internacionalização, possibilitando a exportação de vinhos mais caros. Isso obriga à profissionalização do Marketing em toda a fileira do vinho, reconhecendo a importância da gestão da Marca como fonte de valor em complemento ao valor do próprio vinho e a um rigoroso esforço na procura de instrumentos de controlo da sua eficácia através de estudos de mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaker, David A. (1994), *Gestión del Valor de la Marca – Capitalizar el Valor de la Marca*. Madrid: Ediciones Diaz de Santos SA
- Anholt, Simon (2007), *Competitive Identity: The new Management of Nations, Cities and Regions*. Great Britain: Palgrave Macmillan
- California Wine Institute (2007), California Wine Awareness & Image Study, http://www.calwinexport.com/files/2007%20Wine%20Report_FINAL.pdf
- Control Board of the Rioja Designation of Origin (2007), Annual Report, <http://www.riojawine.com/en/pdfs/MEMORIACONSEJO2007-INGLES.pdf>
- Consejo Regulador de la Denominacion de Origen Calificada Rioja (2008), Memoria, http://www.riojawine.com/en/pdfs/ESTADISTICAS_RIOJA_2008.pdf
- Cravidão, Mário (2009), Tese de Mestrado A Marca de Vinhos Regional Lisboa – O Plano de Comunicação Internacional, ISCTE
- Dinnie, Keith (2008), *National Branding*. Great Britain: Elsevier Ltd
- Hamlin, Robert, Leith Kevin (2006), *Studying the country-of-origin cue in action: An experimental examination of wine evaluations in the United Kingdom and New Zealand*, Palgrave Macmillan Ltd vol.2, 4, 311-320 Place Branding
- Johnson, Ray; Bruwer, Johan (2007), *Regional Brand Image and Perceived Wine Quality: the consumer perspective* – International Journal of Wine Business Research; vol. 19, N°4, 276-297
- Ollins, Wally (2003), *A Marca*. Lisboa: Editorial Verbo
- Orth, Ulrich; Wolf, Marianne; Dodd, Tim (2005), *Dimensions of Wine Region Equity and their Impact on Consumer Preferences* – The Journal of Product and Brand Management; 14, 2/3; ABI/INFORM Global, Pag.88-97

Ribeiro, José e Branco, Freitas (2008), *Portuguese Quality Wine and the Region-of-Origin Effect: consumers' and retailers' perceptions* – Working Papers Series – NIPE – Universidade do Minho

Valls, Josep-Francesc Valls (1992), *La Imagem de Marca de los Países*. Madrid: McGraw-Hill

Yon, Bernard (2003), *Estudo do Consumidor de Vinho Português de Vinhos* – Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica – ESB/UCP

EFECTO DE LA CANTIDAD DE INÓCULO DE LEVADURAS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ORGANOLÉPTICAS DEL VINO

José A. REGODÓN¹; Emile BELTRAND²; Emiliano ZAMORA³; M^a Luz ÁLVAREZ³ y Manuel RAMIREZ⁴

RESUMEN

Se ha analizado la influencia del tamaño de la población inicial de levaduras (10^5 ó 10^7 células/mL) sobre la cinética de fermentación, parámetros enológicos, aromas y calidad del vino. Se observa que a mayor concentración de inóculo, mayor velocidad de fermentación y número de células/mL durante la fermentación. La adición de extracto de levadura favorece el aumento de la población de levaduras, más en las fermentaciones con inóculo mayor. Las levaduras empezaron a morir muy pronto en las fermentaciones inoculadas con 10^5 células/mL, mientras que en las inoculadas con 10^7 células/mL comenzaron a morir al final de fermentación. Los vinos elaborados sin extracto de levadura resultaron inacabados y dulces, en tanto que entre los obtenidos con extracto de levadura, los mejor evaluados en el análisis organoléptico fueron los inoculados con la menor concentración de levaduras, destacando por sus mejores aromas. En la fermentación de estos vinos se detectó mayor presencia de actividad exo- β (1,3)-glucosidásica en la fase tumultuosa.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, inóculo, aromas, β -glucosidada.

INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación del mosto las levaduras sintetizan enzimas que juegan un papel muy importante en la vinificación (ARÉVALO *et al.*, 2007). Las enzimas más abundantes son las oxidoreductasas, pectinasas, proteasas y β -glucosidasas. Éstas últimas rompen glucósidos precursores de aromas presentes en el mosto, liberando terpenos

¹ Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda Elvas s/n. Badajoz (España).

² IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne BP 17867 21078 DIJON CEDEX (France).

³ Estación Enológica. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Extremadura. Carretera de Sevilla nº 114. Almendralejo, Badajoz (España).

⁴ Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda Elvas s/n. Badajoz (España). E-mail: mramirez@unex.es

que influyen positivamente en la calidad organoléptica del vino. La β -glucosidadas están presentes en las uvas, si bien su tipo y concentración varía con la variedad; por otra parte, varios microorganismos presentes en las fermentaciones pueden producirlas, e incluso se pueden añadir durante el proceso fermentativo para obtener mejores aromas (HUMBERT-GOFFARD *et al.*, 2004).

Una alternativa al empleo de enzimas comerciales podría ser el uso de levaduras seleccionadas productoras de β -glucosidadas, estas enzimas podrían liberar los terpenos sin afectar a otros componentes del mosto y abaratando la producción del vino (HUMBERT-GOFFARD *et al.*, 2004).

Saccharomyces cerevisiae, principal levadura utilizada como inóculo, secreta al medio externo enzimas necesarias para su crecimiento y el de sus yemas hijas, siendo algunas de estas enzimas β -glucosidasas. La secreción está ligada al crecimiento de la población de levaduras. Teóricamente, si la población de levaduras al principio de la fermentación es muy pequeña, tendrá que desarrollarse más que si fuera una población mayor, producir más yemas, más β -glucosidasas, y liberar más compuestos aromáticos de los precursores de la uvas.

El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia del tamaño de la población inicial de levaduras inoculadas y la adición de extracto de levadura a mostos estériles, sobre la cinética de fermentación, los parámetros enológicos, aromas y calidad del vino. Los experimentos se realizaron con mosto de uva blanca esterilizado con Velcorin® para eliminar el efecto colateral de los microorganismos silvestres y controlar con precisión la cantidad de levaduras presentes en el mosto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 9 vinificaciones según el esquema mostrado en la Figura 1.

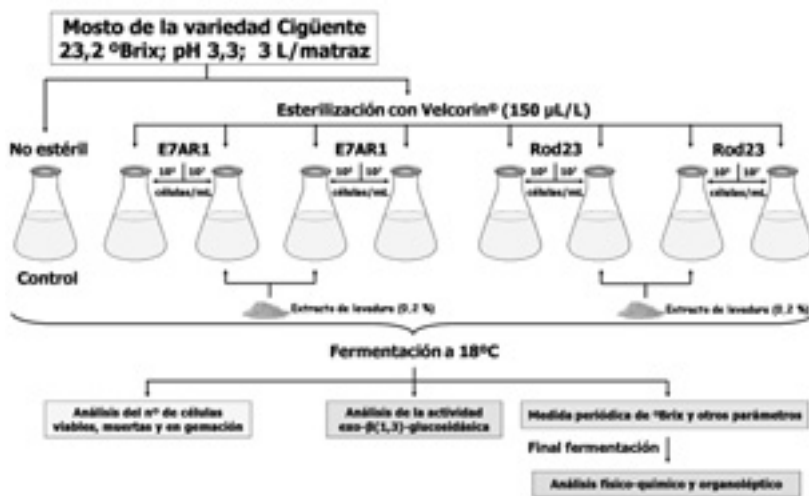


Figura 1. Esquema de la experiencia realizada.

1) Cepas de levaduras: Se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pertenecientes a la colección de nuestro grupo de investigación: **E7AR1**, resistente a cicloheximida (PÉREZ *et al.*, 2000; RAMÍREZ *et al.*, 1998) y **Rod23**, resistente a rodamina (AMBRONA *et al.*, 2006).

2) Mosto: Variedad Cigüente (autóctona de Extremadura), 23,2 °Brix y pH 3,3. El mosto fue esterilizado con Velcorin® (150 µL/L) e inoculado con dos concentraciones distintas de cada levadura (10⁵ y 10⁷ células/mL). Estas fermentaciones se realizaron por duplicado, una con extracto de levadura (0,2 %) como activador de fermentación y otra sin él. Un matraz de mosto no fue inoculado ni esterilizado, realizando la fermentación espontáneamente (**control**).

3) Seguimiento de la fermentación: Se midió periódicamente la densidad y °Brix y se contó el número de células viables por dilución del mosto/vino e inoculación en YEPD-agar. El porcentaje de células muertas se determinó mediante tinción con azul de metileno, y el de levaduras en gemación mediante observación en microscopio.

4) Parámetros físico-químicos: Las determinaciones de grado alcohólico, densidad, pH, acidez total, acidez volátil, azúcares reductores y ácido málico se realizaron según los métodos oficiales de la CEE (E.E.C., 1999). El ácido láctico se determinó según método oficial de la CEE (E.E.C., 1990).

5) Análisis organoléptico: Los vinos obtenidos fueron catados por un panel de expertos pertenecientes a las Estación Enológica de Almedralejo (Badajoz, España).

6) Análisis de la actividad exo- β (1,3)-glucosidásica: Sobre una placa de YEPD-agar (pH 5,8) se añaden 60 μ L de mosto-vino centrifugado tomado en la fase tumultuosa de la fermentación. Una vez seco, se añaden varias gotas de MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucósido) (0,1% en acético-acetato 50 mM, pH 5,2), se incubó 30 minutos a 25°C y se observó la actividad en la placa con transiluminador UV de 312 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación de la fermentación espontánea del mosto con fermentaciones del mosto estéril inoculado con levaduras seleccionadas y sin extracto de levadura.

En la Figura 2 se observa como la fermentación espontánea (control) resultó muy lenta y no terminó correctamente transcurridos 20 días. Las fermentaciones del mosto inoculado con levaduras y sin extracto de levadura son más rápidas, y especialmente las inoculadas con 10^7 células/mL. No obstante, en todos los casos las fermentaciones no finalizaron adecuadamente, denotando la falta de nutrientes del medio.

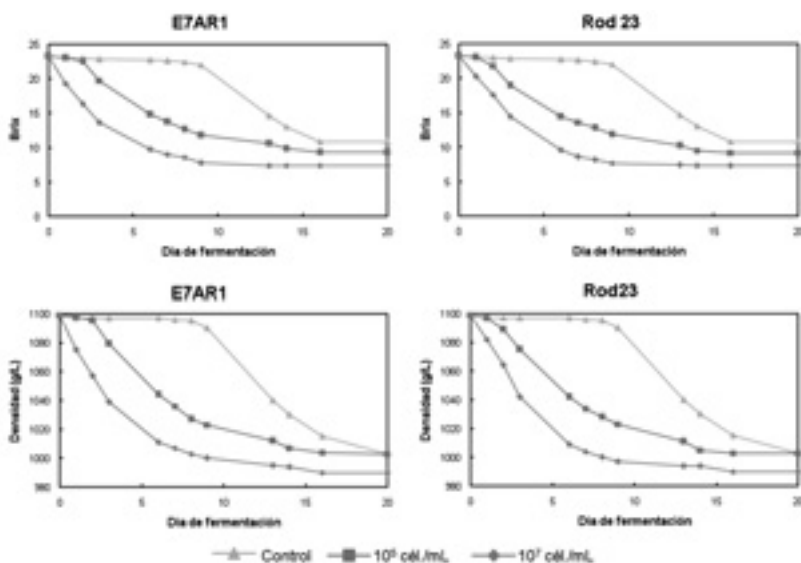


Figura 2. Cinética de fermentación (°Brix y densidad) de los vinos obtenidos sin adición de extracto de levadura al mosto.

Comparación de las fermentaciones de mosto estéril inoculado con distintas concentraciones de levaduras seleccionadas.

En las fermentaciones inoculadas con 10^7 células/mL la población de levaduras alcanzó el máximo habitual en las fermentaciones de mosto, es decir, 10^8 - 10^9 células/mL. Mientras que en las inoculadas con 10^5 células/mL la población dejó de crecer sin alcanzar este máximo, ocasionando un final difícil de fermentación (Figura 3). El problema se corrigió cuando se añadió al mosto extracto de levadura, indicando que una población inicial pequeña requiere más nutrientes para llegar al número necesario de células que permita el desarrollo correcto de la fermentación.

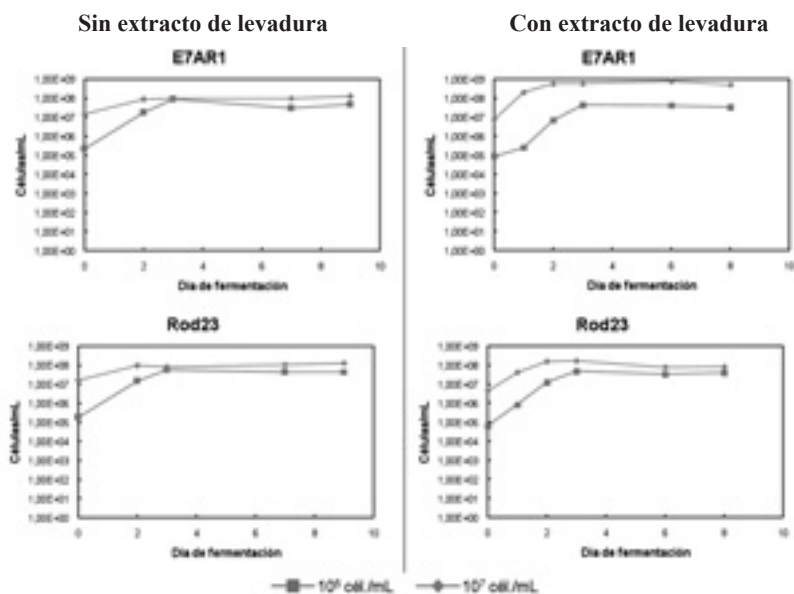


Figura 3. Número de células en las fermentaciones sin y con extracto de levadura.

Como era de esperar, la cantidad de **levaduras con yemas** durante la fermentación fue superior en las fermentaciones inoculadas con 10^5 células/mL que en las inoculadas con 10^7 células/mL (Figura 4). Sin embargo, curiosamente, las levaduras empiezan a morir muy pronto en las fermentaciones inoculadas con 10^5 células/mL, mientras que en las inoculadas con 10^7 células/mL empiezan a morir al final de fermentación, dada la ausencia de nutrientes y la alta concentración de etanol en esta fase del proceso.

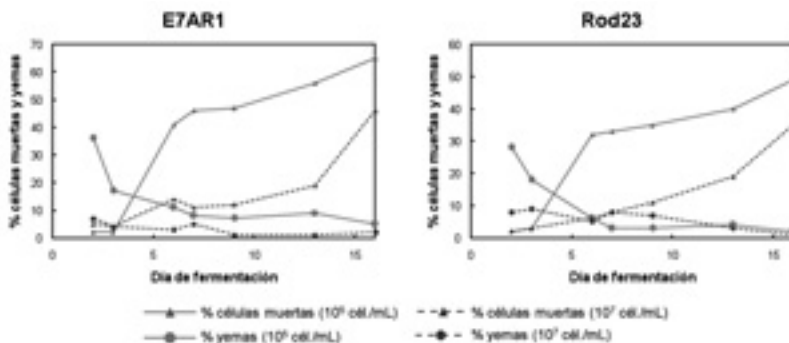


Figura 4. Evolución del porcentaje de células muertas y vivas durante las fermentaciones con extracto de levaduras.

Actividad exo- β (1,3)-glucosidásica.

Parte de estas enzimas liberadas en el vino son inactivadas por su pH bajo (por debajo de pH 4,8 se produce inactivación), por lo que cabe esperar poca actividad de las mismas en general (Ramírez *et al.*, 1987). No obstante, se observó que la actividad exo- β (1,3)-glucosidásica en el vino de Rod23 (Figura 5) fue mayor cuando se inoculó con 10^5 células/mL que con 10^7 , lo que puede haber contribuido a aumentar la percepción frutal del vino elaborado con menor cantidad de levaduras iniciales (como se indicará más adelante). Para los vinos elaborados con E7AR1, la diferencia de actividad no fue tan evidente.

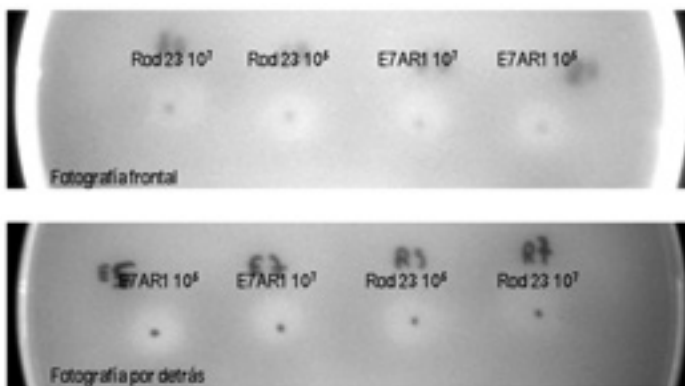


Figura 5. Actividad exo- β (1,3)-glucosidásica en placas de YEPD (fotografía frontal y posterior de la placa).

Análisis físico-químico.

Los vinos elaborados se esterilizaron con Velcorin® y se almacenaron a 4°C hasta el momento del análisis organoléptico para evitar la actividad microbiana incontrolada durante su almacenamiento. En la Figura 6 se observa la efectividad del tratamiento.

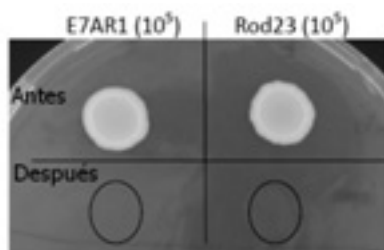


Figura 6. Ensayo en placa de la efectividad del tratamiento con Velcorin® del vino.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en el análisis de los vinos inoculados. El vino control no se analizó dado que no finalizó adecuadamente la fermentación.

| | E7ARI | | | | Rod23 | | | |
|----------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | Sin extracto de levadura | | Con extracto de levadura | | Sin extracto de levadura | | Con extracto de levadura | |
| | 10 ⁵ | 10 ⁷ | 10 ⁵ | 10 ⁷ | 10 ⁵ | 10 ⁷ | 10 ⁵ | 10 ⁷ |
| Células/mL | | | | | | | | |
| °Alcohólico | 14,17 | 14,44 | 14,98 | 14,71 | 13,59 | 14,41 | 14,45 | 14,52 |
| Densidad (g/L) | 994,7 | 992,1 | 992,3 | 988 | 1000 | 991,1 | 993,1 | 988,8 |
| AZ | 15,0 | 10,3 | 12,7 | 2,5 | 22,2 | 7,7 | 12,3 | 2,2 |
| AT | 4,9 | 5,6 | 4,9 | 6,0 | 5,3 | 5,7 | 5,3 | 6,2 |
| AV | 0,31 | 0,44 | 0,47 | 0,58 | 0,45 | 0,50 | 0,67 | 0,65 |
| pH | 3,49 | 3,47 | 3,52 | 3,45 | 3,56 | 3,46 | 3,50 | 3,48 |
| Ácido láctico (g/L) | 0,06 | 0,04 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 |
| Ácido málico (g/L) | 1,61 | 1,29 | 1,81 | 1,83 | 1,84 | 1,65 | 1,90 | 1,84 |

AZ = azúcares reductores en g/L; AT = acidez total en g/L de ácido tartárico; AV= acidez volátil en g/L de ácido acético.

Tabla 1. Análisis de los vinos inoculados.

Se observa que el mayor grado alcohólico se consigue al adicionar extracto de levadura al mosto, ya que con éste se permite que las levaduras consuman más azúcares y por tanto produzcan más alcohol. Sin embargo, el tamaño del inóculo no parece influir, mostrando resultados variables.

El contenido de azúcares reductores en los vinos elaborados sin adición de extracto de levadura y con el menor inóculo mostró niveles muy elevados, los cuales disminuyen al añadir extracto de levadura y aumentar el inóculo. Por tanto, la adición de extracto de levadura y mayor inóculo de levaduras favorecieron el desarrollo de la fermentación. En el primer caso porque se añaden nutrientes al medio, y en el segundo porque se necesitan menos nutrientes para aumentar la población de levadura.

Como consecuencia de las altas concentraciones de azúcares reductores en algunos vinos, sus densidades fueron muy altas, incluso de 1000 g/L en el caso del vino de Rod23 (10^5 células/mL, sin adición de extracto de levaduras).

Los valores más altos de acidez total (y los menores de pH) se obtuvieron con los mayores inóculos y con extracto de levadura. Lo que conduce a pensar que el menor crecimiento de las levaduras favorece el aumento de acidez total del medio.

Las mayores concentraciones de acidez volátil correspondieron a los vinos elaborados con extracto de levadura, al igual que ocurrió con el ácido málico. Finalmente, la concentración de ácido láctico fue muy baja en todos los vinos, indicando la ausencia de fermentación maloláctica en estos vinos.

Análisis organoléptico.

El vino control y los elaborados sin extracto de levadura presentaron características organolépticas rechazables por resultar inacabados y dulces, y no fue necesario catarlos.

El análisis organoléptico de los vinos elaborados con extracto de levadura muestra que los vinos inoculados con 10^7 células/mL presentaron un ligero aroma a lías, en tanto que los elaborados con la menor concentración de inóculo tenían aromas más afrutados, lo cual puede estar relacionado con la mayor producción de exo- β (1,3)-glucosidasa observada claramente en la fermentación de Rod23.

Los mejores vinos fueron los elaborados con menor inóculo (10^5 células/mL) de la levadura E7AR1, con mejores aromas y más intensos que el resto. Tanto el gusto

como el aroma de los vinos de E7AR1 resultaron más agradables, confirmando que dicha levadura presenta mejores actitudes enológicas que Rod23 como ya habíamos observado en otras ocasiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrona, J., Vinagre, A., Maqueda, M., Álvarez, M.L. y Ramírez, M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J Agric Food Chem* 54: 2977-2984.
- Arévalo, M., Ubeda, J.F. y Briones, A.I. (2007). B-Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 420-425.
- E.E.C. Official Report of the European Community, N° 761 (1999). Modificación del Reglamento E.E.C N° 2676/90. 10.
- E.E.C. Official Report of the European Community, N° 2676 (1990). Métodos de análisis comunitarios aplicables al sector del vino. 191.
- Humbert-Goffard, A., Saucier, C., Moine-Ledoux, V., Canal-Llaubères, R.M., Dubourdiou, D., Glories, Y. (2004). An assay for glucanase activity in wine. *Enzyme and Microbial Technology* 34:537-543.
- Pérez, F., Regodón, J.A., Valdés, M.E., De Miguel, C. y Ramírez, M. (2000). Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiol* 17: 119-128.
- Ramírez, M., Andaluz, E. y Larriba, G. (1987). Purification of two exoglucanases secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and partial characterization of their protein moieties. *Microbiología* 3: 195-203.
- Ramírez, M., Pérez, F. y Regodón, J.A. (1998). A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 5039-5041.



OCORRÊNCIA DE FLORES ATÍPICAS NA CV. ARAGONEZ (*Vitis vinifera* L.)

Ilda ABREU^{1,2}; Ricardo PINTO¹; Paulo COSTA³; Geni C. ZANOL⁴ & José EIRAS-DIAS⁴

RESUMO

As flores de *Vitis vinifera* L., no momento da ântese, destacam a caliptra, ficando visíveis os estames e os carpelos. Em algumas plantas da cv. Aragonéz (Tinta Roriz), a flor é atípica dado que não liberta a caliptra, abrindo em estrela e as pétalas permanecem agarradas ao receptáculo floral. Também, os filetes são curtos, o estigma sésil e os nectários pouco desenvolvidos. As flores atípicas e as flores normais podem ocorrer na mesma planta e até na mesma inflorescência.

Nas plantas de flores atípicas, comparativamente às de flores normais, verificou-se baixa produtividade, com uma menor dimensão dos frutos e ausência ou reduzido número de sementes. Também a análise de parâmetros químicos dos bagos revelou diferenças.

A análise de DNA, utilizando marcadores de microssatélites, não revelou diferenças entre as plantas de flores normais e as plantas de flores atípicas.

Estudos posteriores serão necessários no sentido de comparar a fertilidade polínica (viabilidade e germinação do grão de pólen) entre os dois tipos de flores, bem como verificar se as plantas conservam as mesmas características florais em anos consecutivos.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, cv Aragonéz, caliptra, flores atípicas, pólen, microssatélites

1 - INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das culturas de grande tradição nas regiões temperadas, quer para a produção de uva de mesa quer pela sua utilização vinícola. As inflorescências de *Vitis vinifera* no momento da deiscência possuem uma caliptra resultante da adesão de células marginais das pétalas (SRINIVASAN e MULLINS, 1976). Na fase da ântese, as pétalas inicialmente soltam-se na região basal, enrolando-se. A ruptura das paredes celulares de pétalas adjacentes ocorre através de um processo semelhante à abscisão.

¹ Departamento de Biologia da FCUP. Rua do Campo Alegre s/n, 4169-007 PORTO.
ianoronh@fc.up.pt

² Grupo de Ambiente, Sociedade e Educação do Centro de Geologia da UP.

³ ADVID – Associação para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense. Quinta de Santa Maria, Apartado 137, 5050-106 GODIM.

⁴ INRB, INIA – Dois Portos. Quinta da Almoíña, 2565-191 DOIS PORTOS.

A cv. Aragonez produz uva tinta, sendo conhecida na região do Douro por Tinta Roriz, e é originária de Valdepeñas (Espanha) com o nome de Tempranillo (*temprano*, que significa cedo), por possuir precoce amadurecimento dos frutos. Contudo, pode assumir outras designações de acordo com o país e região de cultivo.

Esta cultivar é de fácil adaptação a diferentes climas ou solos e, por isso, o seu cultivo tem aumentado, para além da região do Douro, nas regiões do Dão, Tejo, Estremadura e Alentejo. As condições ideais de cultivo são os climas quentes e secos, para a obtenção de cachos de bagos mais concentrados, levando a uma diminuição da produção.

Na região do Douro, verificou-se que algumas videiras da cv. Aragonez apresentavam diferenças no processo de abertura da flor, não formando caliptra, ocorrendo a abertura da flor na parte superior, de modo que as pétalas ficavam agarradas pela parte inferior do receptáculo.

Dada a importância da vinha e do vinho em Portugal e no Mundo, a ocorrência de flores atípicas, que implicam uma diminuição da produtividade, é um fenómeno cujo estudo se revela de elevado interesse. Em Portugal não há conhecimento de trabalhos publicados com o registo de observações daquela diferença morfológica em qualquer cultivar, no entanto foi descrita em outras cultivares noutros países, nomeadamente no Brasil (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998), na Austrália (LONGBOTTOM *et al.*, 2004; LONGBOTTOM *et al.*, 2008) e na Turquia (GOKBAYRAK *et al.*, 2009).

Uma vez que assumimos que a ocorrência de flores atípicas tem implicações a nível do rendimento de produção, os objectivos deste trabalho foram comparar a nível morfológico, bioquímico e molecular as plantas da cv. Aragonez que apresentam flores com caliptra e flores sem caliptra.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Na Quinta do Bom Retiro, Freguesia de Valença do Douro, Concelho de Tabuaço, Distrito de Viseu (41°09'25,65"N, 7°32'49,78"W, 370 m) e na Quinta da Carvalhosa, Freguesia de Santo Adrião, Concelho de Armamar, Distrito de Viseu (41°08'36,33"N, 7°38'29,93"W, 100 m) foram observadas, em cepas da cv. Aragonez, inflorescências cujas flores, no momento da ântese, não formavam caliptra. Foram marcadas cepas de flores normais e de flores atípicas e recolhido material como anteras, pólen e estruturas foliares jovens para trabalhos laboratoriais subsequentes.

As anteras foram removidas de ambas as flores no estado fenológico I (BAGGIOLINI, 1952) e, em laboratório, foram observadas e fotografadas à lupa. Das anteras retiraram-se os grãos de pólen, que foram observados e quantificados ao microscópio óptico Leica a 400X. Os parâmetros morfológicos como diâmetro equatorial e polar e área de pólen deiscente foram directamente determinados ao microscópio óptico.

Procedeu-se à observação ao microscópio electrónico de varrimento dos dois tipos de flores e do pólen. Para tal, todo o material vegetal foi fixado em glutaraldeído e tetróxido de ósmio seguido de desidratação em etanol. Após secagem em estufa a 50°C, as anteras e pólen foram colocados em suportes previamente revestidos com película de carbono. Posteriormente, procedeu-se ao revestimento das amostras com ouro, no impregnador JEOL FC 1100, e à observação ao microscópio electrónico de varrimento FEI QUANTA 400 FEG ESEM/EDAX PEGASUS X4.

Das amostras foliares conservadas a -80°C, foi extraído o DNA segundo THOMAS *et al.* (1993) com ligeiras modificações. Na amplificação de microssatélites (PCR) foram utilizados iniciadores (*primers*) para 9 *loci*, sendo 6 reconhecidos pela “Organisation Internationale de la Vigne et du Vin” (OIV) na discriminação de cultivares de *Vitis vinifera* L., nomeadamente, VVMD5 e VVMD7 (BOWERS *et al.*, 1996), VVMD27 (BOWERS *et al.*, 1999), VrZag62 e VrZag79 (SEFC *et al.*, 1999), VVS2 (THOMAS e SCOTT, 1993), e os três recomendados pelo projecto GRAPEGEN06, VVMD25, VVMD28 e VVMD32 (BOWERS *et al.*, 1999). Os *primers* foram marcados com fluorocromos específicos para o sequenciador utilizado (Sequenciador SEQ8000 da Beckman Coulter). Os tamanhos dos fragmentos amplificados relativos a cada *locus* foram obtidos para as duas amostras.

No momento da vindima, foram recolhidos 400 bagos (200 provenientes de flores normais e 200 de flores atípicas) para posterior estudo laboratorial dos frutos e das sementes. A partir dos frutos foram determinados o peso (balança electrónica de precisão KERN EW 600-2M), o volume, grau alcoólico provável (refractómetro manual Leica OE200), acidez total e pH (titulador automático CRISON PH-BURETTE 24 1S). O índice de polifenóis totais foi determinado por espectrofotometria UV/VIS (Perkin Elmer LAMBDA 25) a 280 nm em cuvetes de quartzo de 10 mm de percurso óptico após diluição da solução de extracção a pH 3,2 (NAGEL e GLORIES, 1991). As determinações das antocianinas solúveis (A_{pH} 3,2) e totais (A_{pH} 1) foram realizadas segundo o método

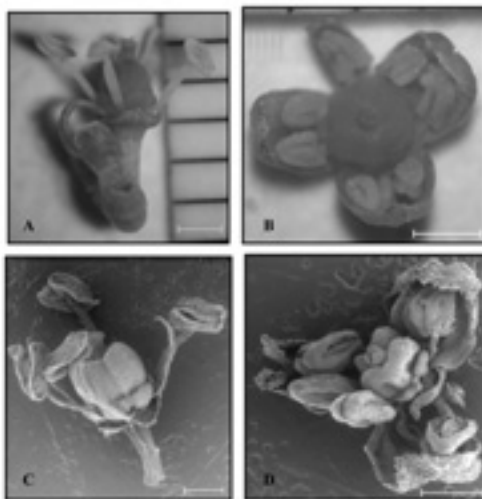
descrito por NAGEL e GLORIES (1991) e medidas por espectrofotometria UV/VIS a 520 nm em cuvetes de vidro de 10 mm de percurso óptico, após maceração das amostras a pH 3,2 (ApH 3,2) e pH 1 (ApH 1). O número total de sementes foi registado e, com o auxílio de uma craveira digital (Digital Caliper - resolução: 0,01 mm) e de uma balança analítica (KERN EW 150-3M), as sementes foram medidas e pesadas.

O tratamento estatístico consistiu na aplicação do Teste Mann-Whitney U, recorrendo ao software STATISTICA, após a avaliação da normalidade e da homogeneidade da variância dos dados.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cv. Aragonéz, observaram-se flores atípicas e flores normais não só em cepas distintas, mas também na mesma planta e até na mesma inflorescência. Ao contrário das flores normais, as flores atípicas possuem filetes curtos, estigma sésil, nectários pouco desenvolvidos e pétalas que permanecem agarradas ao receptáculo floral, não ocorrendo libertação da caliptra (Figura 1).

Figura 1 – Flores normais (A e C) e atípicas (B e D) de *Vitis vinifera* L. cv. Aragonéz. Imagens de microscopia



óptica (A e B, barra = 1cm) e electrónica de varrimento (C e D, barra = 0,5cm).

As nossas observações assemelham-se aos resultados apresentados por outros autores no Brasil com a cv. Itália (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998), na Austrália com as cv. Canada Muscat (*V. vinifera* x *V. labrusca*), Gamay, Pinot Meunier, Chardonnay e Shiraz (LONGBOTTOM *et al.*, 2004; LONGBOTTOM *et al.*, 2008) e na Turquia com a cv. Cardinal (GOKBAYRAK *et al.*, 2009). Na Península Ibérica, não conhecemos referências a esta ocorrência em *Vitis vinifera* L..

Das observações efectuadas, verificamos que o pólen de ambas as flores apresenta forma semelhante sendo radialmente simétrico, isopolar, tricolporado, exina de tecto reticulado e a sexina mais espessa que a nexina. O pólen deste cultivar, quando desidratado, é alongado mas, quando hidratado, apresenta forma esférica (Figura 2).

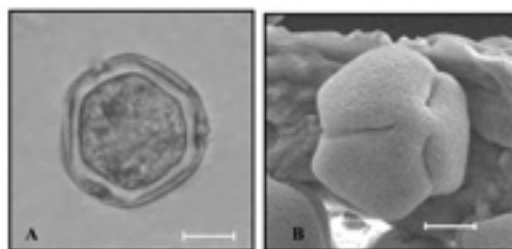


Figura 2 – Pólen hidratado de *Vitis vinifera* L. cv. Aragonez. Imagens de microscopia óptica (A) e electrónica de varrimento (B) (barra = 5 μ m).

Grãos de pólen (162) directamente retirados da antera (pólen desidratado) foram observados ao microscópio óptico Leica (400x) e determinaram-se os principais parâmetros morfológicos, como diâmetro equatorial (E) e polar (P), área de pólen e a relação P/E (Quadro 1).

Quadro 1 - Diâmetro equatorial (E) e polar (P), área de pólen e razão P/E

| | Média |
|--------------------------------|--------------------|
| Diâmetro polar (μ m) | 28,31 \pm 2,22 |
| Diâmetro equatorial (μ m) | 15,97 \pm 1,58 |
| P/E | 1,78 \pm 0,38 |
| Área (μ m ²) | 361,81 \pm 53,36 |

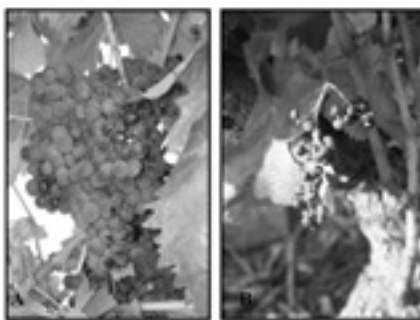
No Quadro 2 está representado o tamanho dos fragmentos amplificados dos *loci* de microssatélites (em número de nucleótidos), para as duas amostras foliares consideradas. A análise dos resultados permite-nos garantir que, embora a flor apresente uma morfologia diferente, estamos perante indivíduos da mesma cultivar.

Quadro 2 – Tamanho dos fragmentos amplificados para os *loci* dos microssatélites (em número de nucleótidos), em amostras foliares retiradas de plantas com flores normais e plantas com flores atípicas

| SSR | VVMD5 | | VVMD7 | | VVMD25 | | VVMD27 | | VVMD28 | | VVMD32 | | VzZAG62 | | VzZAG79 | | VVS2 | |
|----------|-------|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|---------|-----|---------|-----|------|-----|
| Amostras | 236 | 236 | 239 | 253 | 243 | 257 | 183 | 183 | 259 | 259 | 251 | 253 | 196 | 200 | 247 | 251 | 145 | 147 |

Durante a vindima, verificou-se que tinha havido diferenças no vingamento dos frutos conforme se tratavam de flores normais (Fig. 3A) ou de flores atípicas (Fig. 3B). Como se pode ver pelas figuras, os cachos das flores atípicas possuem menor número de bagos que predominantemente são de menor tamanho. Por este facto, podemos associar as flores atípicas a um baixo vingamento e, conseqüentemente, a uma menor produtividade.

Figura 3 – Exemplos extremos de cachos formados em videiras com flores normais (A) e com flores atípicas (B).



As análises físico-químicas efectuadas aos frutos colhidos durante a vindima (09 de Setembro de 2009) mostram que o peso e o volume são inferiores na amostra proveniente

de plantas com flores atípicas, tal como o índice de maturação das grainhas (Mp)¹, enquanto que o índice de polifenóis totais (IPT), os valores de antocianinas solúveis (ApH 3,2) e totais (ApH 1) e a maturação celular (EA)² são mais elevados (Quadro 3).

Estes resultados reflectem a produção de frutos de composição diferente e anormal quando provenientes de flores atípicas, pois os valores obtidos para os frutos provenientes de flores normais assemelham-se aos obtidos por outros investigadores para esta cultivar (QUINTAS *et al.*, 2004).

Quadro 3 – Análises físico-químicas dos frutos

| Amostras (09.09.2009) | Análise de rotina | | | | | Análise dos compostos Fenólicos | | | | |
|--------------------------|-------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----|---------------------------------|----------------|------------------|-----------|-----------|
| | Peso (g) | Volume (mL) | Alcool Precipável (% vol/vol) | Acidez Total (g/L. Ác. Tartárico) | pH | IPT | ApH1 (mg/L) | ApH3,2 (mg/L) | EA (%) | Mp (%) |
| Normal | 470 | 262 | 11,8 | 4,8 | 3,3 | 36,1 | 847,0 | 560,0 | 33,9 | 37,9 |
| Atípica | 106 | 48 | 15,2 | 4,9 | 3,4 | 70,5 | 3199,5 | 1586,4 | 50,4 | 10,0 |

(No Quadro 4 estão registados os valores biométricos obtidos das sementes retiradas dos 400 bagos recolhidos. Destacam-se valores mais elevados nas sementes provenientes de frutos de flores normais. A análise estatística, pelo Teste de Mann-Whitney U, mostrou que comprimento (C), largura (L) e C/L são significativamente diferentes nas duas amostras, ao nível de $p < 0,01$.

¹ Índice de maturação das grainhas:

$$Mp = \frac{(IPT \cdot ApH3,2) \cdot 100}{IPT}$$

² Índice de maturação celular:

$$EA = \left(\frac{ApH1 - ApH3,2}{ApH1} \right) \cdot 100$$

Quadro 4 – Análises biométricas realizadas às sementes extraídas de amostras de 200 bagos

| | Normal | Atípica |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Número total de sementes | 364 | 67 |
| Peso médio por semente (mg) | 25,55 | 14,33 |
| Comprimento* (mm) | 5,84 ± 0,38 | 4,29 ± 1,28 |
| Largura* (mm) | 3,64 ± 0,38 | 2,86 ± 1,02 |
| C.V.* | 1,63 ± 0,21 | 1,57 ± 0,31 |

* Pelo teste de Mann-Whitney U, os parâmetros são significativamente diferentes ao nível de $p < 0,01$.

A ocorrência de flores atípicas tem necessariamente que ser acompanhada em anos consecutivos nas mesmas videiras, dado que há investigadores que admitiram que este fenómeno não se repete em gerações sucessivas (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998; LONGBOTTOM *et al.*, 2004).

Este trabalho teve o apoio financeiro do Programa de Financiamento Plurianual de Instituição de Investigação da FCT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGIOLINI M. (1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue d'Agriculture et d'Arboriculture* **8**:4-6.
- BOWERS J.E., DANGL G.S. & MEREDITH C.P. (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**:243-246.
- BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R. & MEREDITH C.P. (1996). DNA isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) *Genome* **39**:628-633.
- GOKBAYRAK Z., DARDENIZ A., SOYLEMEZOGLU G. & KIZILCIK S. (2009). Occurrence of star flowers in Cardinal (*Vitis vinifera* L.) cv. *African Journal of Agricultural Research* **4**(8):713-717.
- LONGBOTTOM M.L., DRY P.R. & SEDGLEY M. (2004). A research note on the occurrence of 'star' flowers in grapevines: Observations during the 2003-2004 growing season. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**(3):199-202.

- Longbottom M.L., Dry P.R. & Sedgley M. (2008). Observations on the morphology and development of star flowers of *Vitis vinifera* L. cvs Chardonnay and Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**(3):203-210.
- Nagel C.W. & Glories Y. (1991). Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols, *Am. J. Enol. Vitic.* **42**:364-366.
- Queiroz-Voltan R.B., Jung-Mendacolli S.L. & Pommer C.V. (1998). Ocorrência de inflorescências anormais em videira 'Italia'. *Sci. Agric.* **55**(1):153-157.
- Quintas A., Correia M.J., Braga F., Oliveira A. & Magalhães N. (2004). Análise da evolução da maturação da casta Tinta Roriz a diferentes altitudes. In: *6º Simpósio de Viticultura do Alentejo* 1:30-37 Évora 2004.
- SEFC K.M., Regner F., Turetschek E., Glossl J. & Steinkellner H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**:367-373.
- Srinivasan C. & Mullins M.G. (1976). Reproductive anatomy of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): origin and development of the anlage and its derivatives. *Annals of Botany* **40**(169):1079-1084.
- Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P. & Scott P. (1993). Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* **86**:173-180.
- Thomas M.R. & Scott N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* **86**:985-990.



AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRONÓMICO DE CLONES DA CASTA ARAGONEZ E SUA CARACTERIZAÇÃO AMPELOMÉTRICA

Ricardo ANDRADE¹, Luís C. CARNEIRO², Amândio CRUZ³, Pedro CLÍMACO⁴, Rogério de CASTRO⁵

RESUMO

Com o objectivo de caracterizar alguns clones já admitidos à certificação, num contexto ambiental diferente dos ensaios que estiveram na base das respectivas homologações, foram instalados, em 2003, numa parcela experimental localizada na Estremadura (39°01'46"N e 9°01'35"W; altitude 99m), 12 clones admitidos à certificação (13, 24, 51, 78, 56, 59, 117, 106, 110, 111, 114 e 776) e ainda uma selecção candidata àquele estatuto, que recebeu do proponente o n.º 230. Os dados foram colhidos no ano de 2009, tendo os parâmetros rendimento, n.º de cachos por cepa, peso médio do cacho, grau alcoólico provável e acidez total revelado diferenças significativas entre os clones estudados. Com base nas medições da folha e da grainha, foi possível classificar os clones em diferentes grupos, tendo um dos clones apresentado características que o isolou dos demais, no respectivo fenograma.

Palavras-chave: Aragonez, casta, clone, rendimento, qualidade, ampelometria

1. INTRODUÇÃO

A casta Aragonez é uma casta alóctone, mas de introdução muito antiga no encepamento nacional (Clímaco, 1997). Segundo os dados oficiais (IVV, 2006), é a terceira casta tinta com maior representatividade em Portugal Continental, sendo a sua presença tradicional em algumas das denominações de origem com maior prestígio (Banza *et al.*

¹ Associação Nacional de Viveiristas Vitícolas Produtores de Material Certificado, email: geral@viticert.mail.pt

² Instituto Nacional dos Recursos Biológicos/INIA-Oeiras, email: luis.c.carneiro@gmail.com

³ Instituto Superior de Agronomia, Viticultura, email: rcastro@isa.utl.pt

⁴ Instituto Nacional dos Recursos Biológicos/INIA-Dois Portos, email: evn.pclimaco@mail.net4b.pt

⁵ Instituto Superior de Agronomia, Viticultura, email: rcastro@isa.utl.pt

2001; Salvador, 2005). Na Estremadura, onde a sua introdução é recente, tem originado vinhos elementares que têm encontrado boa receptividade por parte do consumidor (Ghira, 2004). Face ao desenvolvimento da casta, a necessidade em material de multiplicação e o interesse por clones seleccionados tem aumentado (Andrade, 2009). Actualmente, encontram-se em multiplicação no território nacional 21 clones de Aragonéz com diversas origens geográficas.

O comportamento produtivo e qualitativo de um clone pode ser avaliado com base em numerosos parâmetros agrónomicos e enológicos, no entanto, a influência ambiental (solo, clima, práticas culturais...), que assume frequentemente um peso elevado, faz com que o potencial de cada clone esteja estreitamente ligado ao local onde se realizou a sua avaliação, não sendo necessariamente reprodutível noutra situação (Magalhães, 2008; Martins *et al.*, 2004a).

Por estas razões foi decidido avaliar o comportamento de alguns clones admitidos à certificação, com diferentes origens geográficas, num ambiente diferente dos locais onde foram conduzidos os ensaios que estiveram na base das respectivas homologações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi instalado na Quinta da Torre (39°01'46"N e 9°01'35"W; altitude 99m), concelho de Torres Vedras, em plena região IGP Lisboa, segundo um delinea-mento experimental em blocos casualizados, constituído por 4 blocos (repetições) em que as parcelas (clones) foram distribuídas aleatoriamente. No total, o ensaio comporta 52 unidades experimentais, cada uma constituída por um conjunto de seis videiras con-tíguas. O solo pertence à classe dos Fluvissoles Calcários – FLc (FAO/UNESCO, 1990). O clima da região, segundo a classificação de Thornthwaite-Mather, é do tipo sub-hú-mido chuvoso, com moderada deficiência de água no Verão, mesotérmico, e nula ou pe-quena concentração de eficiência térmica na estação quente - C₂ s B₂' a' - (Magalhães, 2008).

O estudo incidiu sobre clones da casta Aragonéz provenientes de trabalhos de selec-ção realizados em diferentes países. Os clones 13, 24, 51 e 78 foram seleccionados em Espanha; os clones 56, 59, 106, 110, 111, 114, 117 e 230 (este último com o estatuto de selecção candidata), em Portugal; o clone 776, de origem espanhola, foi admitido à certificação em França.

Os clones foram enxertados no porta-enxerto 1103P e plantados em 2003 com um compasso de 2,80 x 1,20 m, correspondente a uma densidade de 2 976 cepas por hectare, a orientação das linhas é N-S. Na vinha, conduzida em monopiano vertical ascendente, e podada em cordão *Royal* bilateral, a carga média deixada à poda, por cepa, foi de 28 olhos (aproximadamente 83 300 olhos/ha).

A superfície foliar exposta (SFE) foi estimada com base no modelo proposto por Murisier e Zufferey (1997), que considera a sebe como um paralelepípedo iluminado na face superior e nas faces laterais. Em cada unidade experimental, a 20 de Agosto, foram realizadas 5 medições.

Para o estudo filométrico utilizaram-se 20 folhas adultas de cada clone, colhidas entre o vingamento e o pintor, do 9º nó de varas normais, produtivas, com médio desenvolvimento e sem anomalias (Coelho *et al.*, 2004). Cada folha foi caracterizada pelas 11 variáveis indicadas na figura 1, que segundo Rocha (2003) são aquelas que apresentam maior poder discriminante. As distâncias, medidas em folhas herborizadas, foram transformadas através de uma regra de três simples, a um comprimento da nervura principal mediana de 100 mm (Carneiro, 1987).

A avaliação carpométrica incidiu sobre 30 grainhas obtidas a partir de bagos maduros e seleccionadas conforme o proposto por Pêgo *et al.* (1998). O comprimento e a largura (Cunha *et al.*, 2007) foram determinados com o auxílio de uma craveira digital (Figura 1).

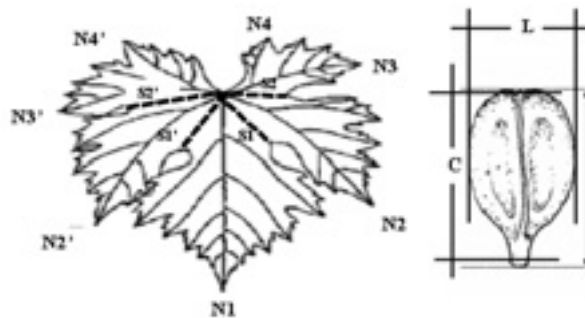


Figura 1 – Esquema da folha e grainha com indicação das distâncias medidas: N, comprimento das nervuras; S, profundidade dos seios laterais; L, largura; C, comprimento (adaptado de OIV, 2007; Cunha *et al.*, 2007).

À vindima, realizada a 22 de Setembro, em cada unidade experimental foram colhidos 100 bagos e determinado o grau alcoólico provável (por refractometria), a acidez total (titulação colorimétrica) e o pH (potenciometria) do respectivo mosto. Foi ainda pesada a produção de uvas e contado o número de cachos. À poda, foi registado o número de sarmentos, com um comprimento superior a 20 cm e pesada a lenha de poda por unidade experimental.

No estudo ampelométrico, a análise de dados foi efectuada com recurso a métodos de taxonomia numérica, utilizando-se o programa NTSYS – PC, versão 2.1, desenvolvido por Rohlf (2000). Para calcular as semelhanças ou diferenças entre os clones utilizou-se como coeficiente a “distância euclidiana média”, sendo os resultados agregados pelo método UPGMA⁶ e apresentados sob a forma de fenograma. Para medir a distorção do fenograma foi calculado o coeficiente de correlação cofenética. Nos restantes casos, a análise estatística dos dados colhidos foi realizada recorrendo ao programa STATISTICA, versão 6.0, efectuando o teste F para a análise de variância, sendo os resultados expressos como: *n.s.*, não significativo, significativos para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). Sempre que a análise revelou diferenças significativas procedeu-se à comparação de médias com base no teste de Duncan, com um nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comportamento agronómico

De uma maneira geral, os clones de Aragonez em estudo evidenciaram possuir um elevado potencial produtivo, o qual se baseia não só num elevado peso médio do cacho (> 200 g) mas ainda num considerável número de cachos /cepa (≥ 24).

A observação do Quadro 1 permite-nos conhecer o potencial produtivo de cada clone, nas condições de ensaio. Assim, os clones 24, 59 e 78 distinguem-se muito significativamente dos clones 13, 106 e 230 por induzirem maior rendimento. Os restantes clones apresentam, naturalmente, valores intermédios. De salientar que o clone 59, o mais produtivo, se distingue ainda, muito significativamente, dos clones 110 e 776.

⁶ Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages⁷

Quadro 1 – Parâmetros do rendimento e características dos bagos à vindima⁷

| Clone | Rendimento (t/ha) | N.º cachos/cepa | Peso médio do cacho (g) | Peso médio do bago (g) | TAP (% v/v) | pH | Ac. Total (g/l ác. tart.) |
|-------|-------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|-------------|------|---------------------------|
| 13 | 24,0 cde | 31,2 abc | 258 cd | 2,54 | 13,0 a | 3,22 | 5,5 d |
| 24 | 32,1 ab | 34,5 a | 313 ab | 2,68 | 11,7 bc | 3,16 | 5,4 d |
| 51 | 30,5 abc | 32,1 ab | 321 ab | 2,82 | 11,6 c | 3,13 | 5,8 abcd |
| 56 | 28,8 abcd | 30,7 abc | 316 ab | 2,41 | 11,9 abc | 3,18 | 5,5 cd |
| 59 | 33,4 a | 35,8 a | 314 ab | 2,69 | 11,4 c | 3,17 | 5,6 bcd |
| 78 | 33,1 ab | 36,8 a | 303 ab | 2,79 | 11,7 bc | 3,14 | 5,7 abcd |
| 106 | 21,5 e | 24,7 bc | 290 bc | 2,79 | 12,9 ab | 3,19 | 5,9 abcd |
| 110 | 26,4 bcde | 36,6 a | 242 d | 2,58 | 13,1 a | 3,16 | 6,2 ab |
| 111 | 29,2 abcd | 29,8 abc | 334 a | 2,87 | 12,4 abc | 3,19 | 5,6 cd |
| 114 | 30,4 abcd | 30,2 abc | 339 a | 2,80 | 11,9 abc | 3,11 | 6,2 a |
| 117 | 28,4 abcd | 30,2 abc | 318 ab | 2,85 | 12,1 abc | 3,14 | 6,0 abc |
| 230 | 23,8 de | 24,0 c | 335 a | 2,75 | 12,2 abc | 3,17 | 5,8 abcd |
| 776 | 26,7 bcde | 32,1 ab | 279 bcd | 2,61 | 12,2 abc | 3,23 | 5,3 d |
| Sig. | ** | ** | *** | n.s. | * | n.s. | * |

Quando se analisa os componentes do rendimento, verifica-se que os clones 24, 59, 78 e 110 sobressaem por possuírem um número de cachos/cepa significativamente superior aos clones 106 e 230, e que os clones 111, 114 e 230 se distinguem por apresentarem um peso médio do cacho significativamente superior ao dos clones 13, 106, 110 e 776. O peso médio do bago é genericamente elevado, variando entre 2,41 e 2,87 gramas.

Quanto às características qualitativas do mosto, o destaque vai para o teor em álcool provável (TAP), o qual é significativamente muito superior nos clones 13 e 110 relativamente aos clones 24, 51, 59 e 78. Quanto a este parâmetro, salienta-se ainda que o clone 106 também se distingue dos clones 51 e 59. No que respeita à acidez total, o clone 110 sobressai por apresentar simultaneamente o mais elevado teor em álcool provável e em acidez total. Nos valores de pH, todos eles inferiores a 3,24, não se registam diferenças significativas.

⁷ Nota: Sig. - nível de significância: n.s. - não significativo ao nível de 0,05 pelo teste de F; * - significativo ao nível de 0,05; ** - significativo ao nível de 0,01; *** - significativo ao nível de 0,001. Em cada coluna os valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo teste de Duncan.

A análise conjunta dos dados obtidos neste ensaio permite-nos estudar a influência do rendimento e da razão SFE/rendimento no teor em álcool provável do mosto (Figura 2). Verifica-se, assim, que os clones com rendimento mais baixo são, também, aqueles cujo mosto apresenta maior TAP ($R^2= 0,577$). Esta correlação está de acordo com as observações referidas na bibliografia (Huglin e Schneider, 1998; Sousa *et al.* 1998; Castro *et al.*, 2006). Inversamente, uma razão SFE/rendimento mais elevada está associada a um aumento daquele parâmetro qualitativo ($R^2= 0,418$). Os valores obtidos são, contudo, muito afastados do valor de referência, 1 m²SFE / 1 kg de uvas, tido como óptimo para a acumulação de açúcares no bago (Murisier e Zufferey, 2007).

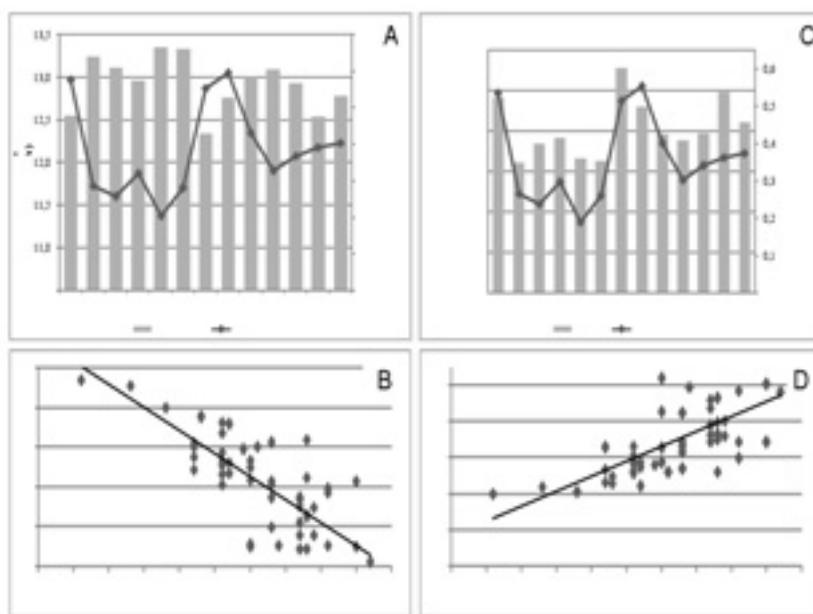


Figura 2 – A relação TAP (%v/v) / rendimento (t/ha) (A e B) e a variação do TAP (%v/v) em função da razão SFE/rendimento (m²/kg) (C e D).⁸

⁸ **Nota:** Sig. - nível de significância: *n.s.* - não significativo ao nível de 0,05 pelo teste de F; * - significativo ao nível de 0,05; ** - significativo ao nível de 0,01; *** - significativo ao nível de 0,001. Em cada coluna os valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo teste de Duncan.

A análise dos parâmetros relativos ao vigor e à expressão vegetativa (Quadro 2), mostra que o clone 13 apresenta um peso médio por vara significativamente superior aos clones 24, 51, 56, 59, 78 e 776. O clone 24 distingue-se, negativamente, dos restantes clones por apresentar menor peso por vara. Ainda assim, a gama de valores encontra-se nos níveis de equilíbrio (40 a 60 g por vara) referidos por Magalhães (2008).

O peso da lenha de poda reflecte essencialmente as diferenças observadas no peso médio da vara, já que o n.º de varas/cepa não registou diferenças significativas.

Quadro 2 – Parâmetros relativos ao vigor e à expressão vegetativa⁹

| Clone | N.º médio de varas/cepa | Peso médio da vara (g) | Peso da lenha de poda (kg/cepa) | Índice de Ravaz |
|-------|-------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|
| 13 | 28,2 | 57,4 a | 1,6 a | 5,01 ef |
| 24 | 29,5 | 37,0 d | 1,1 d | 9,98 a |
| 51 | 29,7 | 47,7 bc | 1,4 ab | 7,32 cd |
| 56 | 27,6 | 48,7 bc | 1,3 bc | 7,28 cde |
| 59 | 30,1 | 46,8 bc | 1,4 ab | 7,97 abc |
| 78 | 27,7 | 41,7 cd | 1,2 cd | 9,65 ab |
| 106 | 31,4 | 50,2 abc | 1,6 ab | 4,70 f |
| 110 | 30,2 | 51,8 ab | 1,6 ab | 5,83 cdef |
| 111 | 29,3 | 50,3 abc | 1,5 ab | 6,97 cdef |
| 114 | 28,0 | 49,0 abc | 1,4 abc | 7,67 bc |
| 117 | 27,3 | 54,4 ab | 1,5 ab | 6,44 cdef |
| 230 | 30,1 | 51,5 ab | 1,6 ab | 5,19 def |
| 776 | 29,2 | 47,1 bc | 1,4 abc | 6,61 cdef |
| Sig. | n.s. | *** | *** | *** |

⁹ Nota: Sig. - nível de significância: n.s. - não significativo ao nível de 0,05 pelo teste de F; * - significativo ao nível de 0,05; ** - significativo ao nível de 0,01; *** - significativo ao nível de 0,001. Em cada coluna os valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo teste de Duncan.

No que respeita ao índice de Ravaz é interessante verificar que os clones 24, 59 e 78, os mais produtivos, se distinguem muito significativamente dos clones 13, 106 e 230, os menos produtivos. Por outro lado, verifica-se uma tendência para os clones com índice de Ravaz inferior a 6 (clones 13, 106, 110 e 230) apresentarem um TAP mais elevado. Com excepção do clone 106, os restantes clones estudados apresentam valores apropriados daquele índice (entre 5 e 10, segundo Smart e Robinson, 1991).

3.2 Caracterização ampelométrica

O fenograma das distâncias (Figura 3) evidencia uma nítida separação entre os clones estudados, sendo possível relacionar os clones portugueses com os clones espanhóis, mediante a sua zona de origem. O clone 78, originário da região espanhola da Rioja, aparece destacado dos restantes e constitui o primeiro grupo. Também Rubio e Yuste (2004) concluíram que este clone se afastava dos restantes clones seleccionados naquela região, mas muito próximo de um clone originário da região de Toro.

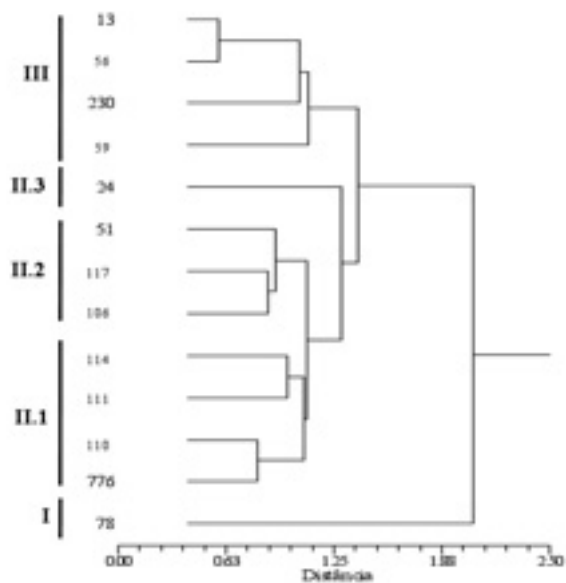


Figura 3 – Fenograma construído pelo método de agregação UMGPA (coeficiente de correlação cofenética de 0,871).

O segundo grupo é formado por 8 clones, organizados em três subgrupos: o II.1 é constituído por três clones portugueses (110, 111 e 114) e pelo clone 776 (Rioja), o grupo II.2 por dois clones portugueses (106 e 117) e o clone 51 (Rioja), o II.3 é formado pelo clone 24 (Rioja). Finalmente, o último grupo compreende três clones de origem portuguesa e um clone originário da zona da Mancha. Estes resultados, obtidos com base em características ampelométricas, apontam para a existência de diversidade morfológica da casta nos dois países, embora Martins *et al.* (2004b) tenham encontrado maior variabilidade genética na sub-população desta casta na região de Valdepeñas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade R., 2009. Caracterização do potencial de produção do sector viveirista vitícola. *In: Actas do 1.º Congresso Internacional dos Vinhos do Dão.*
- Banza J., Antunes A., Gonçalves E., Laureano O., Magalhães N., Guerra J., Carvalho J.B., Carneiro L.C., Martins A., 2001. Selecção clonal das castas Aragonez e Síria nas suas principais regiões de cultura. *In: Actas do 5.º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 1, 63-68. Évora.
- Carneiro L.C., 1987. Aplicação dos métodos de taxonomia numérica à ampelografia de *Vitis vinifera* L., 85 p., Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Castro R., Cruz A., Botelho M., 2006. Tecnologia Vitícola. Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, 160 p..
- Clímaco P., 1997. *Influência da cultivar e do ambiente na maturação da uva e na produtividade da videira (Vitis vinifera L.)*, 121 p., Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Coelho I., Cunha J., Carneiro L.C., Castro R., Eiras-Dias J., 2004. Comparação ampelométrica de populações selvagens de *Vitis vinifera* L. e de castas antigas do Sul de Portugal. *Ciência Téc. Vitiv.*, 19 (1): 1-12.
- Cunha J., Cunha J.P., Carneiro L.C., Fevereiro P., Eiras-Dias J., 2007. Carpometria da grainha na identificação de ancestrais selvagens de *Vitis vinifera* L.. *Ciência Téc. Vitiv.*, 22 (2): 29-34.
- FAO/UNESCO, 1990. *Soil map of the world. Revised legend*, 119 p. Roma.
- Ghira J., 2004. Os Vinhos da Estremadura. Colecção dos Vinhos de Portugal, 183 p., Chaves Ferreira – Publicações Lisboa.

- Huglin P., Schneider, C., 1995. *Biologie et écologie de la vigne*, 2^e Édition, 370 p., Tec & Doc-Lavoisier, Paris.
- IVV, 2006. *Vinhos e Aguardentes de Portugal*. Anuário 06/07. Lisboa.
- Magalhães N., 2008. *Tratado de Viticultura - A videira, a vinha, o terroir*, 605 p., Chaves Ferreira – Publicações. Lisboa.
- Martins A., Gonçalves E., Carneiro L.C., Ashtari S., 2004a. Instabilidade do rendimento de clones de videira resultante da interacção genótipo x ambiente e estratégias experimentais para a sua redução. *In: Actas do 6.º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 1, 97-102. Évora.
- Martins A., Carneiro L.C., Martins J., Gonçalves E., Banza J., Laureano O., Piteira A., Perdiz F., 2004b. Primeiros resultados da quantificação da variabilidade genética e da selecção da casta Aragonez à escala das regiões de Rioja, Valdepeñas, Douro e Alentejo. *In: Actas do 6.º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 1, 1-6. Évora.
- Murisier, F.; Zufferey V., 2007. Influence de la densité de plantation et de la hauteur de la haie foliaire sur qualité des raisins et des vins. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 39 (4): 251-255.
- Murisier F., Zufferey V., 1997. Rapport feuille-fruit de la vigne et qualité du raisin. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 29 (6): 355-362.
- OIV 2007. *Liste des Descripteurs OIV pour les Variétés et Espèces de Vitis*, 2^e. Édition, 233p. OIV, Paris.
- Pêgo R., Eiras-Dias J., Martins A., 1998. Carpometric characterization of grapevine cultivars. *In: Extendend abstracts of XXIII Congrès Mondial de la Vigne et du Vin* (1): 9-16, Lisboa, Portugal.
- Rocha M.L., 2003. *Análise intravarietal de uma população de clones de Arinto (Vitis vinifera L.)*. 96p.. Provas de acesso à categoria de investigador auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas – Estação Agronómica Nacional, Oeiras.
- Rohlf F., 2000. NTSYSpc version 2.1, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook N.Y.*
- Rubio J., Yuste J., 2004. Ampelographic differentiation of Tempranillo clones from different area origin, according to their synonyms. *Acta Hort*, 652: 73-79.
- Salvador J., 2005. 16 Castas Portuguesas, 72 p., *Jornal de Notícias*.
- Smart R., Robinson M., 1991. *Sun light into wine. A Hand Book for Wine Grape canopy Management*. Ed. Winetitles, Adelaide.

Sousa M., Azevedo J., Pereira J., Cruz A., Castro R., 1998. Cépages nobles du Douro, conditionnalis-
lismes du porte-greffe et de l'écosystème. In: *Extendend abstracts of XXIII Congrès Mondial
de la Vigne et du Vin* (1): 51-69, Lisboa, Portugal.



ESTUDO DA EFICÁCIA DE UM BIOFERTILIZANTE À BASE DE QUITOSANA NO CONTROLO DE DOENÇAS DO LENHO DA Videira

João CASTRO PINTO¹

Um biofertilizante à base de quitosana, comercializado com a denominação Tecnifol Defender, revelou-se eficaz no combate às doenças do lenho da vinha, nomeadamente as escorioses. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* com videiras envasadas, bem como numerosos ensaios de campo, comprovaram que o Tecnifol Defender inibe o crescimento micelial dos mais importantes fungos do lenho da videira, e é tão ou mais eficaz do que diversos fungicidas utilizados habitualmente no combate a estas doenças. Como vantagem adicional pode-se referir a diminuição da quantidade de tratamentos fungicidas realizados e dos correspondentes resíduos deixados na cultura.

A quitosana, matéria-prima do Tecnifol Defender, é uma fibra biopolimérica natural, retirada da quitina existente no hexoesqueleto de diversos crustáceos. É um produto de rápida absorção, totalmente biodegradável e pouco tóxico. Os mecanismos de acção da quitosana não estão totalmente esclarecidos. Pensa-se que as plantas ao serem pulverizadas com quitosana, produzem fitoalexinas, compostos fenólicos e enzimas (quitinases e glucanases) com actividade anti-fúngica. Simultaneamente, a quitosana induz a síntese de materiais parecidos com lenhina, fortalecendo as paredes celulares das plantas e criando barreiras estruturais aos ataques dos fungos.

Os estudos para a avaliação do efeito biopesticida da quitosana foram coordenados pelo Instituto Superior de Agronomia. Nos ensaios *in vitro* a quitosana do Tecnifol Defender foi testada contra os *Botryosphaeria* sp., *Neonectria liriodendri*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia* sp., *Phaeoniella chlamydospora*, *Phomopsis viticola*. e *Truncatella* sp. Comprovou-se a sua eficácia biológica *in vitro*, isto é, inibição do desenvolvimento do micélio dos fungos *Phomopsis* sp. (escoriose americana) e *Fomitiporia* sp. (um dos fungos responsáveis por esca). Para os restantes fungos, em particular para *Eutypa* (eutipiose) e para *N. liriodendri* (pé negro), a quitosana mostrou também alguma actividade biológica, inibindo o crescimento dos micélios. Nos ensaios *in vivo* videiras da casta Castelão (Periquita) foram postas a vegetar em substratos infestados de *Neonectria liriodendri* e *Pa. chlamydospora*, agentes do pé negro e da esca da videira. Os tratamentos foliares com Tecnifol Defender tiveram como testemunhas um ensaio em branco com água e 3 fungicidas de referência: tebuconazole, carbendazim+flusilazol e ciprodinil+fludioxonil. O Tecnifol Defender aumentou significativamente a altura das plantas e o nº de raízes das plantas, e reduziu o desenvolvimento dos fungos, tendo tido um efeito melhor ou comparável aos fungicidas. Nos 3 anos de ensaios de campo instalados em Reguengos de Monsaraz, a vinha enxertada com as castas Castelão e Aragonês, tinha sido sujeita a severos ataques de escoriose. Efectuaram-se 2 tratamentos nos estados fenológicos B/C (gomo de algodão /ponta verde) e C/D (ponta verde /saída das folhas), de acordo com as seguintes modalidades: controlo em branco com água, piraclostrobina+metirame, azoxistrobina, e

¹ ADP – Fertilizantes. Apartado 88. 2616-907 Alverca do Ribatejo. Portugal.
castropinto@adp-fertilizantes.pt.

quitosana (Tecnifol Defender). Comprovou-se que a quitosana proporciona uma diminuição da incidência de escoriose (percentagem total de sarmentos infectados) e da severidade do ataque (área necrosada nos entrenós infectados), comparativamente com a ausência de tratamento; por outro lado, a quitosana tem um efeito semelhante aos fungicidas utilizados como testemunhas neste ensaio.

Com o objectivo de avaliar a eficácia do Tecnifol Defender no controlo dos sintomas de escoriose, efectuaram-se 18 demonstrações nas principais regiões vitícolas do país – Vinhos Verdes, Douro, Dão, Bairrada, Ribatejo e Alentejo – nas castas Touriga Nacional, Trincadeira, Loureiro, Fernão Pires, Rabo de Ovelha, Cabernet Sauvignon e Pinot Noir. Os tratamentos foram efectuados na época mais apropriada, tendo como testemunhas a prática habitual do agricultor, nomeadamente a aplicação dos fungicidas Cabrio Top, Rhodax, Quadris, Quadris Max, Maestro M, mancozebe, enxofre, e o produto fosfanato de potássio. Verificou-se que a quitosana teve um comportamento bastante superior às testemunhas em 11 parcelas (critério: diferenças iguais ou superiores a 10%), e um comportamento semelhante aos produtos testemunhas nos restantes casos (critério: diferenças inferiores a 10%), podendo-se concluir que o Tecnifol Defender pode substituir os fungicidas clássicos no controlo dos fungos das escorioses.

Palavras chave: Quitosana, doenças do lenho, escorioses.

1. INTRODUÇÃO

A quitosana, matéria-prima do Tecnifol Defender, é uma fibra biopolimérica natural, produzida através da desacetilação da quitina existente no hexoesqueleto de diversos crustáceos, como o camarão, lagosta e caranguejo. Em agricultura é utilizada para melhorar as propriedades dos solos, revestir sementes, activar o desenvolvimento radicular e estimular o crescimento das plantas, melhorar a sua sanidade geral, conferir resistência a vírus e bactérias, e controlar doenças causadas por fungos. A quitosana é um produto de rápida absorção, totalmente biodegradável e pouco tóxico. Os seus mecanismos de acção não estão totalmente esclarecidos. Pensa-se que as plantas ao serem pulverizadas com quitosana, têm como resposta fisiológica a produção de substâncias antibióticas, nomeadamente fitoalexinas, compostos fenólicos e enzimas (quitinases e glucanases) com actividade anti-fúngica. Simultaneamente, a quitosana induz a síntese de materiais parecidos com lenhina, fortalecendo as paredes celulares das plantas e criando barreiras estruturais aos ataques dos fungos e outros organismos, enquanto ataca e destrói os tecidos e células dos agentes patogénicos. Assim, a quitosana controla os microrganismos patogénicos e por outro lado, activa as diversas respostas de defesa das

plantas, induzindo ou inibindo diferentes actividades bioquímicas durante a interacção patogénio-hospedeiro. Adicionalmente à acção com agente preventivo da ocorrência de diversas ataques fitossanitários, a quitosana do Tecnifol Defender tem uma comprovada acção bioestimulante do metabolismo vegetal, tendo as plantas tratadas uma maior taxa de abrolhamento, maior taxa fotossintética, capacidade superior de absorção e utilização dos nutrientes do solo, um maior desenvolvimento radicular e da parte aérea, e um mais rápido amadurecimento dos frutos. Por último, a quitosana apresenta como vantagem suplementar o facto de a sua utilização em substituição de produtos agroquímicos proporcionar uma diminuição da quantidade de resíduos deixados sobre as culturas.

2. ENSAIOS *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* realizados pelo DPPF do Instituto Superior de Agronomia, tiveram como objectivo testar a eficácia da quitosana em relação a um conjunto de fungos, para muitos dos quais não existem soluções para o seu controlo, através da luta química tradicional. O Tecnifol Defender foi testado contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria* sp., *Neonectria liriodendri*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia* sp., *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phomopsis viticola*. e *Truncatella* sp. Estes fungos foram postos a crescer em placas de Petri contendo um meio de cultura adequado (potato dextrose agar) adicionado de várias concentrações de Tecnifol Defender. Realizaram-se seis repetições por concentração e por espécie de fungo estudado. Como testemunha usou-se o mesmo meio de cultura, sem adição de Tecnifol Defender.

Comprovou-se que a quitosana do Tecnifol Defender tem eficácia biológica *in vitro*, isto é, inibiu o desenvolvimento do micélio dos seguintes fungos: *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta), *Phomopsis* sp. (escoriose americana), *Fomitiporia* sp. (um dos fungos responsáveis por esca), *Eutypa lata* (eutipiose) e *Phaeoconiella* (doença de Petri e esca). Para os restantes fungos, em particular para o *N. liriodendri* (pé negro), o Tecnifol Defender mostrou também alguma actividade biológica, essencialmente fungistática, inibindo o crescimento dos micélios.

3. ENSAIOS EM VASO

Nos ensaios *in vivo* em vaso efectuados pelo ISA, videiras da casta Castelão (Periquita) foram postas a vegetar em substratos infestados de *Neonectria liriodendri* e *Phaemoniella chlamydospora*, agentes do pé negro e da esca da videira. Os tratamentos foliares com a quitosana do Tecnifol Defender tiveram como testemunhas um ensaio em branco com água e 3 fungicidas de referência: tebuconazole, carbendazim+flusilazol e ciprodinil+fludioxonil. No final do ensaio, as plantas foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: altura das plantas, número total de raízes e percentagem de reisolamento do fungo. Os dados foram sujeitos a ANOVA e as médias comparadas segundo o teste de Tukey HSD, com um nível de significância de 0,05. Conforme se pode observar no Quadro nº1, o Tecnifol Defender aumentou significativamente a altura das plantas, tendo sido o produto que proporcionou resultados mais homogêneos, aumentando também o número total de raízes, e reduziu a percentagem de reisolamento dos fungos, i.é, o seu desenvolvimento, tendo tido um efeito melhor ou comparável aos fungicidas em ensaio.

Quadro nº1 – Efeito de diferentes tratamentos em plantas de videira envasadas, crescendo em substratos infestados com *Neonectria liriodendri* e *Phaemoniella chlamydospora*

| Tratamento | Altura da planta (mm) | | Nº total de raízes | | Reisolamento/ (propagação) (%) | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | N. <i>Liriodendri</i> | P. <i>chlamydosp.</i> | N. <i>Liriodendri</i> | P. <i>chlamydosp.</i> | N. <i>Liriodendri</i> | P. <i>chlamydosp.</i> |
| Água | 106 a | 153 ab | 34 a | 31 a | 81 a | 18 a |
| Tebuconazole | 106 ab | 121 a | 45 ab | 38 a | 43 ab | 7 ab |
| carbendazim + flusilazol | 113 ab | 176 b | 51 bc | 44 a | 40 ab | 12 ab |
| Ciprodinil + fludioxonil | 141 ab | 185 b | 60 c | 46 a | 22 b | 4 b |
| T Defender | 137 b | 156 ab | 46 b | 47 a | 32 b | 3 b |

4. ENSAIOS DE CAMPO

Os ensaios de campo decorreram durante 3 anos em Reguengos de Monsaraz, numa vinha enxertada com as castas Castelão (Periquita) e Aragonês, sujeita a severos ataques de escorioses. O objectivo deste ensaios foi avaliar a eficácia da quitosana do Tecnifol Defender e de dois fungicidas de referência, no controlo de fungos do lenho da videira e responsáveis por “black dead arm” (*Botryosphaeria* spp.) e escoriose ame-

ricana (*Phomopsis* spp.). Efectuaram-se 2 tratamentos nos estados fenológicos B/C (gomo de algodão /ponta verde) e C/D (ponta verde /saída das folhas), de acordo com as seguintes modalidades: controlo em branco com água, piraclostrobina+metirame (Cabrio Top) à concentração de 150 g/hl, azoxistrobina (Quadris Max) à concentração de 150 ml/hl e quitosana (Tecnifol Defender) à concentração de 175 ml/hl. O delineamento experimental usado foi o descrito na norma OEPP Standard PP 1/55(2), casualização global, com algumas alterações. A percentagem de sarmentos infectados (incidência da doença) e a percentagem de superfície necrosada nos sarmentos infectados (severidade da doença) foram avaliadas numa população total de 120 videiras (4 modalidades x 10 repetições x 3 videiras = 120 videiras) e 1440 sarmentos já que, cada videira tinha em média 12 sarmentos. Para efeitos de análise, considerou-se o valor médio da percentagem de sarmentos infectados em três videiras de cada unidade experimental, (incidência - %) e o valor médio da percentagem de infecção nos sarmentos infectados em cada unidade experimental (severidade - %). Os resultados foram submetidos a análise da variância (ANOVA) com efeitos fixos e distribuição normal, utilizando um delineamento totalmente casualizado e um nível de significância de 0,05, com recurso ao programa STATISTICA 6.0. Os valores expressos em percentagens sofreram transformação angular ($\arcsen \sqrt{x}$), antes de se proceder à ANOVA. A comparação dos valores médios dos resultados obtidos foi realizada através dos testes de Tukey HSD (com nível de significância de 0,05). No Quadro nº2 podem-se observar os principais resultados ao longo dos 3 anos, e respectiva análise estatística.

Quadro nº2 – Efeito de diferentes tratamentos em videiras com sintomas de “black dead arm” (“*Botryosphaeria* spp.”) e escoriose americana (*Phomopsis* spp.)

| Modalidades | Variedade Castelhó | | | | | | Variedade Aragonês | | | | | |
|-------------|--------------------|------|-------|----------------|------|------|--------------------|------|-------|----------------|------|------|
| | Incidência (%) | | | Severidade (%) | | | Incidência (%) | | | Severidade (%) | | |
| | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Controlo | 36 b | 42 b | 46 c | 26 b | 33 c | 36 b | 32 b | 32 c | 38 c | 30 c | 16 b | 30 b |
| Cabrio T | 6 a | 25 a | 6 a | 6 a | 5 a | 9 a | 11 a | 6 a | 6 a | 8 ab | 8 a | 8 a |
| Quadris | 14 a | 28 a | 16 b | 9 a | 12 b | 15 a | 15 ab | 20 b | 24 bc | 17 bc | 5 a | 22 b |
| T Defender | 5 a | 19 a | 17 ab | 4 a | 6 ab | 16 a | 5 a | 11 a | 19 b | 5 a | 8 a | 18 b |

Comprovou-se que a quitosana proporcionou uma diminuição da incidência de escorioses (percentagem total de sarmentos infectados) e da severidade do ataque (área necrosada nos entrenós infectados), comparativamente com a ausência de tratamento; por outro lado, a quitosana teve um efeito semelhante aos fungicidas utilizados como testemunhas neste ensaio.

5. PARCELAS DEMONSTRATIVAS

Com o objectivo de avaliar a eficácia do Tecnifol Defender no controlo dos sintomas de escoriose, efectuaram-se 18 demonstrações nas principais regiões vitícolas do país – Vinhos Verdes, Douro, Dão, Bairrada, Ribatejo e Alentejo. Os tratamentos foram efectuados na época mais apropriada, tendo como testemunhas a pratica habitual do agricultor, nomeadamente os fungicidas Cabrio Top (s.a. metirame+piraclostrobina), Rhodax Flash (s.a. folpete+fosetil alumínio), Quadris (s.a. azoxistrobina), Quadris Max (s.a. azoxistrobina+folepe), Maestro M (s.a. fosetil alumínio+mancozebe), mancozebe, enxofre, e fosfanato de potássio. Em todos os casos, aplicou-se num mínimo de 1 hectare 175 ml/hl de Tecnifol Defender, tendo a restante folha da mesma casta servido de testemunha, e recebido o tratamento habitual na propriedade. Os volumes de calda oscilaram entre os 150 e os 300 l/ha, sendo iguais em ambos os tratamentos. As observações foram efectuadas, na maioria dos casos, em micro-parcelas de 3 cepas, casualmente seleccionadas por toda a folha tratada com cada uma das modalidades, e com 6 a 12 repetições. No que respeita às castas, efectuaram-se 10 demonstrações em Touriga Nacional, 3 em Trincadeira, e uma em cada uma das seguintes: Loureiro, Fernão Pires, Rabo de Ovelha, Cabernet Sauvignon e Pinot Noire. Avaliou-se o efeito agronómico dos produtos em ensaio de duas formas: nos casos mais simples, por contagem de pânpanos com e sem sintomas de escorioses; nos casos mais completos, por contagem dos pânpanos afectados pela doença e, numa data posterior, uma estimativa da intensidade do ataque.

Em 3 das demonstrações efectuadas não se registaram resultados, por ausência de sintomas ou, pelo contrário, por um ataque intenso e generalizado por toda a parcela, que impossibilitou o apuramento de diferenças. Nas restantes vinhas, conclui-se que o Tecnifol Defender teve um comportamento bastante superior às testemunhas em 11 parcelas demonstrativas (critério: diferenças iguais ou superiores a 10%, empiricamente consideradas significativas), concretamente em Lamego, Pinhão, V. N. Foz Côa, Nelas,

Baleizão (T. Nacional), Tramagal, Pegões (Trincadeira), Braga (Loureiro), Anadia (Fernão Pires), Periquita (Borba) e Pinot Noire (Baleizão), e teve um comportamento semelhante aos produtos testemunhas em 5 casos (critério: diferenças inferiores a 10%, consideradas não significativas). Em nenhuma situação o Tecnifol Defender teve um comportamento agronómico inferior aos tratamentos tradicionais.

CONCLUSÕES

O biofertilizante à base de quitosana comercializado com a denominação Tecnifol Defender, revelou-se eficaz no combate às doenças do lenho da vinha, nomeadamente as escorioses. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* com videiras envasadas, bem como numerosos ensaios e demonstrações de campo, comprovaram que o Tecnifol Defender inibe o crescimento micelial dos mais importantes fungos do lenho da videira, e é tão ou mais eficaz do que diversos fungicidas utilizados habitualmente no combate a estas doenças. Como vantagem adicional pode-se referir a diminuição da quantidade de tratamentos fungicidas realizados e dos correspondentes resíduos deixados na cultura.

Pelos resultados dos estudos *in vitro* prova-se que o Tecnifol Defender é eficaz no tratamento de um conjunto de fungos que provocam o declínio das videiras jovens (*Phaeomoniella*), escorioses da videira (*Phomopsis*, *Botryosphaeria*), eutipiose (*Eutypa*) e esca da videira (*Fomitiporia*, *Phaeomoniella*, *Eutypa*). Por outro lado, o produto é também eficaz no combate ao pé negro da videira (*Cylindrocarpon*) e à esca (*Phaeomoniella*), quando aplicado foliarmente, conforme se comprovou no ensaio em vasos, *in vivo*, em que se obtiveram resultados comparáveis aos fungicidas em estudo. Nos 3 anos de ensaios de campo em duas castas fortemente infectadas de escorioses (black dead arm” e escoriose americana), o Tecnifol Defender, à concentração de 175 ml/hl, foi tão eficaz como os fungicidas de referência no combate a estes fungos, diminuindo a incidência de sintomas (percentagem total de sarmentos infectados) e a severidade do ataque (área necrosada dos sarmentos infectados). Por último, a grande maioria das parcelas demonstrativas efectuadas em vinhas de todo o país, evidenciaram que o Tecnifol Defender aplicado em baixo volume à concentração adequada, é tão ou mais eficaz do que os tratamentos agroquímicos tradicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Oliveira H, Rego C, Nascimento T. 2006. Doenças do lenho da videira: impasses e desenvolvimentos. 3º Simpósio Vitivinícola de Palmela. Palmela.
- Oliveira H, Rego C, Nascimento T, 2006. Avaliação da eficácia da quitosana em relação a doenças causadas por fungos – Relatório Técnico. Comunicação ADP-Fertilizantes.
- Oliveira H, Nascimento T, Rego C. 2007. Eficácia de chitosan relativamente a fungos do lenho da videira, *Botrytis* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* – Relatório Final. Comunicação ADP-Fertilizantes.
- Pinto J.C. 2008. SFT (nome de código do Tecnifol Defender) - Relatório final da experimentação em tratamentos para a escoriose e outros agentes patogénicos. Comunicação pessoal ADP - Fertilizantes.
- Mahmood, T. 2006. Chitin/Chitosan: An Avant-Guarde Product for Better Plant Growth. Grotek Manufacturing Inc.
- Nascimento T, Rego C, Oliveira H. 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46 (2): 218-224.
- Rego C, Nascimento T, Oliveira H. 2010. Control of grapevine wood diseases due to Botryosphaeriaceae fungi and *Phomopsis viticola*. 7 th International Council on Grapevine Trunk Diseases, Santa Cruz, Chile.

EFICÁCIA DE DIFERENTES DESINFECTANTES EM CONDIÇÕES DE ADEGA

Filomena L. DUARTE^{1*}, Alberto LÓPEZ¹, M. Filomena ALEMÃO¹, Rodrigo SANTOS², Sara CANAS¹

RESUMO

A higienização em adega é um dos factores primordiais para a qualidade do vinho. A eficácia da higienização depende em muito da natureza da sujidade a remover, bem como dos processos e produtos a utilizar na limpeza e/ou desinfecção das superfícies. O objectivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de alguns produtos comerciais na desinfecção de depósitos em adega. Este trabalho foi solicitado por uma empresa de produtos comerciais de higienização, usados, designadamente, na indústria alimentar. Para a realização do ensaio foi colocado o mesmo vinho, com uma carga microbiana elevada, em depósitos de aço inoxidável. Após um tempo de contacto de 70 dias, procedeu-se à higienização dos depósitos com os quatro produtos em estudo (em triplicado). Foi efectuada a monitorização do processo por métodos de bioluminescência e de cultura em placa com meio apropriado a diferentes grupos de microrganismos.

Palavras-chave: higienização, desinfectantes, adega, avaliação microbiológica

1 - INTRODUÇÃO

A higienização faz parte das Boas Práticas de Fabrico e tem como objectivos primários a remoção das fontes de contaminação e o controlo das contaminações cruzadas, evitando assim a propagação dos agentes que podem pôr em causa a segurança alimentar e a qualidade do vinho. A higienização compreende, em geral, duas etapas: a limpeza e a desinfecção. A limpeza consiste na remoção completa de resíduos e sujidades das superfícies e equipamentos, mantendo a integridade dos mesmos. Com a desinfecção pretende-se eliminar os microrganismos, até uma quantidade que não comprometa a qualidade e a segurança alimentar do produto. A eficácia da higienização depende em

¹ INRB – L-INIA/Dois Portos, 2565-191 Dois Portos, Portugal

² JohnsonDiversey Portugal, S.A., Sintra, Portugal

*Autor para correspondência: e-mail: filomena.duarte@inrb.pt

muito da natureza da sujidade a remover, bem como dos processos e produtos a utilizar na limpeza e/ou desinfecção das superfícies. É necessário que sejam utilizados os produtos mais adequados ao tipo de sujidades e materiais a que se destinam e que sejam cumpridas as concentrações, tempo de contacto e modo de aplicação estabelecidos. Deste modo evita-se também a selecção de microrganismos resistentes a determinado produto. Em adega, existem resíduos minerais, principalmente bitartrato de potássio, e resíduos orgânicos, procedentes de restos de mosto, de vinho, do filme biológico que se possa ter formado, e que são constituídos ainda por matéria corante, taninos, proteínas, ácidos orgânicos, açúcares e microrganismos (FUSTER, 2006; FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

A avaliação da eficácia da higienização deve ser realizada pela verificação da superfície, devendo esta encontrar-se isenta de resíduos, isenta de químicos e aceitável do ponto de vista microbiológico. Em relação à verificação microbiológica, esta pode ser efectuada por métodos de análise microbiológica clássicos, que apresentam como grande inconveniente o prolongado tempo de resposta (o mínimo de 48 h). O mais comum consiste na contagem de microrganismos por cultura em placa. Podem-se ainda utilizar métodos rápidos que são, em geral, métodos indirectos de avaliação da carga microbiana, como por exemplo a medição do ATP por bioluminescência. Atendendo a que o ATP se encontra presente em todos os organismos vivos, a determinação do ATP por bioluminescência dá uma boa indicação das células vivas presentes na amostra em análise (LONVAUD-FUNEL e JOYEUX, 1982; FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

O objectivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de quatro produtos comerciais na desinfecção de depósitos de aço inoxidável em adega, recorrendo ao método de contagem de microrganismos por cultura em placa e à medição de ATP por bioluminescência.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

O mesmo vinho tinto, com carga microbiana muito elevada, designadamente de leveduras (incluindo do género *Dekkera*), bactérias lácticas e bactérias acéticas (> 3000 UFC/mL) foi distribuído por 36 depósitos de aço inoxidável devidamente higienizados, onde permaneceu durante 70 dias.

2.2 - Higienização dos depósitos

Após esse período de tempo os depósitos foram esvaziados e efectuou-se a sua limpeza e desinfecção. A limpeza consistiu num enxaguamento com água, seguido da pulverização com detergente alcalino (2% v/v; 20 mL/dm²), durante 5 minutos, à temperatura ambiente (~15 °C), e novo enxaguamento. A desinfecção consistiu na aplicação do produto a testar, por pulverização, de acordo com as concentrações indicadas no Quadro 1 (20 mL/dm²), durante 20 minutos, à temperatura ambiente (~15 °C). Cada uma das concentrações foi testada em triplicado, seguindo-se o enxaguamento final com água.

Quadro 1 - Concentrações dos produtos testados

| Produto | Princípio activo | Concentração (%) | | |
|----------|--|------------------|------|------|
| A | Ácido peracético | 0,05 | 0,10 | 0,50 |
| B | Permanganato de potássio | 0,50 | 1,00 | 1,50 |
| C | N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina | 0,25 | 0,50 | 1,00 |
| D | Ácido octenilsuccínico | 0,30 | 0,50 | 1,00 |

2.3 - Avaliação da carga microbiana

Foram colhidas amostras após o processo de limpeza e desinfecção com os produtos em avaliação, nas concentrações indicadas. A bioluminescência foi avaliada na parede e no fundo de todos os depósitos. A contagem de microrganismos por cultura em placa foi efectuada apenas num dos triplicados dos depósitos em ensaio, escolhido aleatoriamente.

2.4 - Bioluminescência

Utilizou-se o SistemSURE II ATP (Higiene, EUA), procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 - Contagem de microrganismos por cultura em placa

Consistiu na colheita de amostras com zaragatoa numa superfície de aproximadamente 10 x 10 cm na parede dos depósitos. A zaragatoa foi agitada vigorosamente em 5 ml do líquido diluente (solução aquosa de 8,5 g/L de cloreto de sódio e 1,0 g/L de trip-tona, esterilizada em autoclave, 121 °C, 20 min.), dos quais 1 mL foi utilizado para cada uma das contagens dos seguintes grupos de microrganismos: leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas e detecção de leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*, recorrendo ao método de filtração por membrana. Os procedimentos seguidos foram os recomendados no “Recueil des Méthodes Internationales d’Analyse – Analyse Microbiologique des Vins et de Moûts” (OIV, 2008). Na detecção de leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* utilizou-se o meio DBDM (Stab Vida), seguindo-se as instruções do fabricante.

3 - RESULTADOS

Os resultados de bioluminescência (valores médios e desvio padrão), relativos a amostras da parede e do fundo dos depósitos e correspondentes a cada concentração de produto testado são apresentados na Figura 1. Consta-se que, apesar do valor do desvio-padrão ser muito elevado, o que poderá estar relacionado com a grande variabilidade associada à amostragem, os valores de bioluminescência são em geral baixos, podendo-se considerar eficaz qualquer concentração dos produtos testados para o fim em questão.

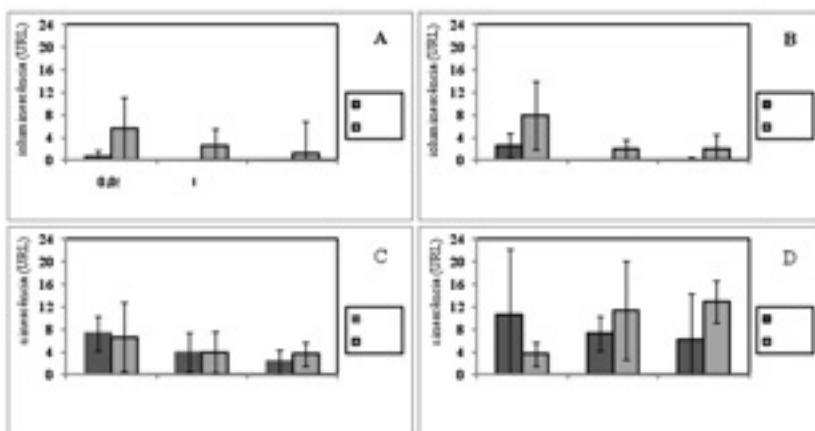


Figura 1 – Valores médios de bioluminescência detectados após a aplicação do produto

Os resultados das contagens após cultura em placa são apresentados no Quadro 2. Para o produto A, após a sua aplicação na concentração mais baixa, foi detectada uma população microbiana elevada, constituída principalmente por bactérias. Para concentrações mais elevadas deste produto detectou-se uma menor população microbiana a que corresponderam valores baixos de bioluminescência. De acordo com os resultados obtidos com o produto A, poder-se-á preconizar uma concentração mínima de 0,10 % (v/v) deste produto para a higienização de depósitos de aço inoxidável em adegas.

Quadro 2 - Carga microbiana presente nos depósitos após desinfeção com os produtos nas concentrações em estudo.

| Produto | Concentração (% v/v) | Leveduras (UFC/dm ²) | Bactérias (UFC/dm ²) | Bioluminescência (URL) |
|-----------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| A | 0,05 | 13 | 143 | 6 |
| | 0,10 | 5 | 3 | 3 |
| | 0,50 | 0 | 0 | 3 |
| B ^{a)} | 0,50 | 25 | 355 | 15 |
| | 1,00 | 10 | 30 | 4 |
| | 1,50 | 15 | 5 | 4 |
| C | 0,25 | 25 | 5 | 22 |
| | 0,50 | 15 | 20 | 14 |
| | 1,00 | 0 | 5 | 13 |
| D | 0,30 | 0 | 0 | 27 |
| | 0,50 | 10 | 0 | 29 |
| | 1,00 | 0 | 5 | 24 |

UFC - unidades formadoras de colónias; URL - unidades relativas de luz;

^{a)} concentração em % (p/v).

Em relação ao produto B a carga microbiana detectada para a concentração mais baixa de produto foi mais elevada do que para o produto A, sendo composta principalmente por bactérias. Detectou-se uma menor carga microbiana com a aplicação de produto em concentrações mais elevadas (1,00 e 1,50 % p/v), bem como valores de bioluminescência mais baixos. Este produto pode ser considerado eficaz do ponto de

vista microbiológico para uma concentração igual ou superior a 1,0 % (p/v) por permitir reduzir consideravelmente a população microbiana.

No que diz respeito aos resultados obtidos com o produto C, verificou-se uma acção idêntica para as três concentrações testadas, traduzida na diminuta população microbiana detectada. É de assinalar que os valores de bioluminescência não apresentaram coerência com os resultados do controlo microbiológico, tendo sido superiores aos detectados após a aplicação dos produtos A e B. Este produto revelou-se eficaz para qualquer das concentrações utilizadas.

Os depósitos desinfectados com o produto D apresentaram cargas microbianas muito baixas, para as contagens após cultura em placa, para qualquer uma das concentrações testadas. Contudo, os valores de bioluminescência detectados foram elevados, dando indicação de uma higienização pouco adequada. Tendo em conta estes resultados e os de testes de eficácia em laboratório (dados não publicados), considera-se que a concentração de 0,50 % (v/v) ou superior de produto D é adequada para higienização de depósitos em adega.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, C.G. (2007) *Winery Cleaning and Sanitizing*, Cap. 9 *IN: Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures*. 2ªed. Springer, Nova Iorque.
- FUSTER, N. (2006) *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas*, Tese de Doutoramento, 160pp, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- LONVAUD-FUNEL, A., JOYEUX A. (1982) *Application de la bioluminescence au denombrement des microorganismos vivants dans les vins*. *Connais. Vigne Vin* **16** (4) 241-256.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO AR NA VARIABILIDADE ESPACIAL E TEMPORAL DA MATURAÇÃO DE UVA PARA VINHO – VARIEDADES: ARAGONÊS, TRINCADEIRA –

J. R. MARQUES DA SILVA^{a,b,*}; PAULO MESQUITA^a; ADÉLIA SOUSA^{a,b};
L. L. SILVA^{a,b}; JOÃO M. R. SERRANO^{a,b}; FÁTIMA BAPTISTA^{a,b}

RESUMO

O conceito de *terroir* no vinho é baseado na observação de que diferentes regiões, vinhas ou mesmo secções diferentes dentro da mesma vinha, podem produzir vinhos com uma identidade muito própria e bem diferente uns dos outros. Os franceses começaram a consolidar este conceito como uma maneira de descrever os aspectos originais de um determinado lugar (solo, topografia e clima), que influencia e molda o vinho feito a partir dele.

Para uma determinada posição geográfica, podemos considerar que o solo e a topografia são fixos no espaço e no tempo, mas não o clima. Na verdade, dentro da mesma vinha, várias regiões microclimáticas podem ser definidas. Os microclimas de uma determinada vinha afectam diferenciadamente a maturação das uvas, criando dessa forma uma variabilidade espacial e temporal da qualidade da uva.

Foram analisadas duas variedades de uva, Aragonês e Trincadeira e para cada variedade foram estudados respectivamente 7 e 6 talhões dentro da vinha do CASITO, pertencente à Fundação Eugénio de Almeida. Nestes talhões e nestas variedades, foi acompanhada a maturação das uvas em três anos consecutivos.

* Autor correspondente. Tel.: +351 266 760823; fax: +351 266 760911

Endereço de E-mail: jmsilva@uevora.pt

^a Departamento de Engenharia Rural, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

^b Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

Como resultado constatou-se que existe uma variabilidade espacial e temporal da maturação da uva entre castas e dentro da mesma casta, abrindo desta forma, a possibilidade para a gestão diferenciada de cada parcela. Contactou-se ainda, que a temperatura mínima do ar, tem uma elevada correlação com a taxa de maturação da uva e que são necessários 400 graus-dia para que a maturação da uva ocorra.

PALAVRAS-CHAVE: variabilidade espacial e temporal da uva, temperatura, Aragonês, Trincadeira

INTRODUÇÃO

O crescimento do fruto da videira (*Vitis vinifera* L.) ajusta-se a uma curva sigmoideal dupla onde as fases I e III estão separadas por uma fase de repouso ou fase II (Matthews *et al.*, 1987). Durante a fase I, o crescimento do pericarpo é rápido, primeiro devido à divisão e alongamento celular e mais tarde, devido apenas ao alongamento celular (Harris *et al.*, 1968). Durante esta etapa os frutos acumulam ácidos orgânicos, mas muito pouco açúcar, permanecendo verdes e duros. A fase II é referida como a fase da paragem do desenvolvimento, uma vez que o crescimento do fruto diminui; retomando-se este crescimento com o início da Fase III, como resultado do alongamento das células. Durante a fase III acumulam-se rapidamente açúcares, a cor nos frutos acentua-se e a concentração dos ácidos orgânicos diminui (Godoy *et al.*, 1998).

Um incremento do vigor da planta induz um desvio dos glúcidos para os órgãos vegetativos em detrimento dos órgãos lenhosos e dos bagos. A maior carga vegetativa por cepa prejudica a fotossíntese e atrasa a maturação dos frutos (Crippen & Morrison, 1986). O aumento do ensombramento no interior do copado é responsável pela diminuição da concentração de açúcares nos bagos (Archer & Strauss, 1990), da maior acidez titulável, do menor pH e da maior concentração de ácido málico (Crippen & Morrison, 1986).

Para além de outros factores a temperatura ambiente é um dos factores com grande impacto na maturação e qualidade dos bagos de uva. Encontram-se na literatura da especialidade vários métodos ou sistemas utilizados para tentar interpretar a relação entre a fisiologia da vinha e a temperatura ambiente. O sistema mais utilizado é conhecido como o somatório graus-dia (Equação 1).

$$GD = (T_m - T_b) X$$

(Eq. 1)

Onde GD (°C.dia) é o valor de graus-dia para um determinado periodo X, T_m a temperatura média desse mesmo periodo, T_b a temperatura base predefinida e X o número de dias do periodo em causa.

O conceito de graus-dia foi desenvolvido inicialmente por Candolle em 1855. Ele descobriu que seria necessário um somatório mínimo anual de 2900 graus-dia acima de um limiar de temperatura de 10°C para o cultivo da vinha (Prescott, 1969). A temperatura base de 10°C foi utilizada devido ao insignificante crescimento da vinha abaixo deste valor. Mais tarde, Gasparin 1860, desenvolveu este sistema e classificou as castas mais populares para vinho em sete grandes grupos de acordo com as suas respectivas datas de maturação e respectivos valores de graus-dia. Amerine & Winkler (1944) realizaram um dos estudos mais conhecidos que relacionou o somatório da temperatura e a fenologia da videira. Estes autores, nas principais regiões vitícolas da Califórnia, avaliaram a influência do clima sobre as diferentes variedades de uva e conseguiram separar as videiras em cinco grandes grupos climáticas com base no sistema graus-dia, utilizando um limiar de temperatura base de 10°C para o período de 1 de Abril a 31 de Outubro. As regiões obtidas constam do Quadro 1.

Quadro 1 – Regiões vitivinícolas de acordo com o somatório dos graus-centígrados-dia

| Região | Somatório de graus-centígrados-dia | Observações |
|--------|------------------------------------|--------------|
| I | < 1390 | Fresca |
| II | 1390-1667 | |
| III | 1667-1945 | |
| IV | 1945-2220 | |
| V | > 2220 | Muito quente |

Amerine & Winkler (1944) forneceram uma descrição geral dos tipos de castas que podem ser cultivadas e os tipos de vinhos que podem ser produzidos a partir de cada uma das cinco categorias, tendo esta sido posteriormente revista por Winkler *et al* (1974).

A temperatura e a luminosidade não só condicionam geograficamente a distribuição da vinha, mas também, dentro da mesma posição geográfica a qualidade da uva bem como dos seus constituintes. Verificou-se em estudos realizados em estufas que os compostos fenólicos de morangos aumentaram quando foram submetidas a regimes de temperatura elevada (Wang & Zheng, 2001). Em videiras a temperatura pode ser também correlacionada positivamente com os teores de compostos fenólicos (acumulação de antocianinas, por exemplo), mas se ultrapassar um determinado limite crítico (alto e baixo) tem normalmente implicações nocivas (Kliewer & Torres, 1972; Spayd *et al.*, 2002; Bradfield & Stamp, 2004) sobre estes teores.

Baseados em modelos de aquecimento global bem como nos efeitos previstos Bradfield & Stamp (2004) estudaram o efeito de temperaturas nocturnas no aumento da produção de compostos fenólicos em tomate. Em termos gerais, variações de temperatura nocturna, não influenciaram a composição total de fenóis, contudo, quando cada um dos compostos fenólicos foi monitorizado em diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) encontraram-se tendências entre o efeito da temperatura e a composição dos mesmos.

Fletcher *et al.* (2005) verificaram que uma temperatura de 30°C pode ter um efeito prejudicial sobre a acumulação de compostos fenólicos nas folhas de hortelã. Os resultados de estudos efectuados em uvas também indicam que as temperaturas nocturnas elevadas e as temperaturas diurnas elevadas e constantes (30°C) impedem a síntese de compostos fenólicos (Kliewer & Torres, 1972; Mori *et al.*, 2005; Yamane *et al.*, 2006).

Uma série de experiências que estudaram a resposta das antocianinas e flavenoides da uva à temperatura, mostrou que as plantas que cresceram sob temperaturas mais elevadas (30-35°C) tiveram significativamente menores concentrações de antocianinas (Mori *et al.*, 2005). Este estudo revelou ainda que plantas que tiveram o seu crescimento com temperaturas constantes da ordem dos 30°C acumularam menos antocianinas que as cultivadas entre 30°C (dia) e 15°C (noite).

Yamane *et al.* (2006) realizaram um estudo semelhante, onde os tratamentos térmicos foram aplicados em vários estágios do desenvolvimento da uva. Neste estudo, o mRNA e os níveis de ácido abscísico (hormona vegetal com funções regulatórias em vários aspectos ligados à fisiologia das plantas, tais como as respostas ao stress hídrico, estímulo da abscisão, inibição da germinação de sementes e o desenvolvimento dos gomos) foram monitorizados conjuntamente com as antocianinas. Verificou-se que o crescimento de duas semanas a 20°C resultou numa concentração de antocianinas superior ao crescimento de duas semanas a 30°C, o que estava de acordo com resultados anteriormente obtidos por Kliewer & Torres (1972), Spayd *et al.* (2002) e Mori *et al.*; (2005). Os resultados do estudo mostram que períodos intermitentes de duas semanas a temperaturas de 30°C inibem geralmente a acumulação de antocianinas nos bagos de uva e tal efeito é independente do estágio de desenvolvimento da planta. Períodos intermitentes de duas semanas a temperaturas de 20°C aumentam a acumulação de antocianinas e são mais efectivos durante a fase III de desenvolvimento. Os valores de ácido abscísico apresentaram uma correlação positiva com a acumulação das antocianinas. Em face dos resultados obtidos, fica bem claro, que as altas temperaturas podem impedir a acumulação de antocianinas em algumas frutas, através da redução na síntese, degradação ou inibição concorrencial (Spayd *et al.*, 2002).

A temperatura, e a sua dinâmica, é pois uma das variáveis controladoras da resposta fisiológica da videira bem como da qualidade dos seus bagos de uva. Tendo a temperatura esta múltipla influência sobre os processos fisiológicos da videira, decidimos analisar se a mesma poderia estar associada e de que forma, à taxa de maturação da uva e consequentemente à previsão da data de colheita.

METODOLOGIA

Descrição do local

Para este estudo foram utilizados dados recolhidos numa vinha em Évora (Lat: 38° 32' 37.87''N; Long: 7° 52' 11.00'' W), localizada na região Alentejo (Sul de Portugal). O estudo foi conduzido em várias parcelas da vinha CASITO, nomeadamente os talhões **2C** (2,6 ha), **2D** (1,8 ha), **5** (4,3 ha), **10** (4,6 ha), **12** (3,3 ha), **15** (4,2 ha) e **21**

(2,8 ha), para a casta Aragonês e os talhões **4** (5,0 ha), **6** (4,2 ha), **7** (4,1 ha), **9** (4,4 ha), **13** (3,7 ha), e **14** (2,2 ha) para a casta Trincadeira.

Os solos predominantes desta vinha são classificados como “Haplic Luvisols” e “Stagnic Luvisols” (FAO, 1998), respectivamente, no topo dos cumes e no fundo dos vales. Os “Haplic” e “Stagnic” Luvisols têm uma textura franco arenosa a arenosa nos horizontes superiores, com o pH a rondar os 6,5-7,5 no primeiro caso e os 5,0-6,0 no segundo caso. A transição entre o primeiro e os horizontes subsequentes (cerca de 0,30 m) é geralmente abrupta, com texturas franco argilo-arenosas a argilosas. A topografia da região pode ser caracterizada como ondulada, com a altimetria a variar entre 239 m e 261 m (Figura 1). O declive varia entre 0% e 10% com orientações de encosta predominantemente de Sul a Noroeste.

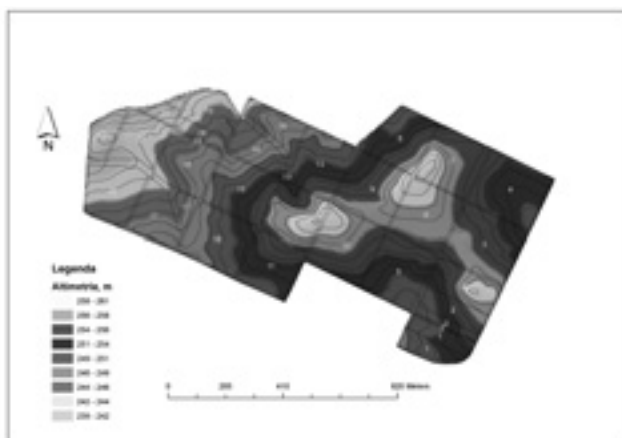


Figura 1 – Altimetria da vinha CASITO e talhões da mesma.

O clima é temperado, com características tipicamente Mediterrâneas. O Verão é geralmente quente e seco e o Inverno húmido e frio, registrando-se na Primavera e no Outono, temperaturas amenas e amplitudes térmicas moderadas. A precipitação média anual é de 550-650 mm e está concentrada principalmente no período do Inverno. A temperatura média é de 16°C. A temperatura máxima média absoluta é de cerca de 21°C e a máxima absoluta de 42°C. A temperatura mínima absoluta média é de cerca de 12°C e a mínima absoluta de -5°C. As características de insolação desta região rondam as 3000 horas/ano e é maior no trimestre anterior à colheita.

Recolha de amostras de uva e análise

Em todos os talhões da vinha CASITO foram recolhidas amostras compósitas de uvas (cerca de 200 uvas) durante o período da manhã. Depois de colhidas, as amostras foram transportadas em sacos de plástico numerados até ao laboratório. Esta amostragem desenvolveu-se normalmente entre o fim de Julho, Agosto e Setembro de 2007, 2008 e 2009. A recolha de amostras e a análise dos parâmetros físico-químicos foram efectuadas com uma periodicidade semanal.

Em laboratório, as amostras de uva foram transformadas em mosto por trituração. Posteriormente, o mosto foi filtrado de forma a eliminar materiais grosseiros em suspensão. As amostras de mosto filtrado foram colocadas em copos numerados e de seguida foram lidas pelo FTIR. Destas leituras resultaram as avaliações de pH, acidez total, álcool provável, antocianinas, polifenóis, compostos azotados, ácido tartárico e ácido málico. No entanto, no âmbito deste artigo serão abordados apenas os temas do álcool provável e do pH da uva.

Índices climáticos

Com o objectivo de caracterizar as temperaturas extremas da região em estudo, foram utilizados índices climáticos adaptados de Tank & Zwiers (2009) descritos no Quadro 2.

Na análise dos dados considerou-se também a Equação 1 adaptada por forma a incluir intervalos temporais de 10 dias (X). Consideraram-se ainda as médias das temperaturas mínimas e não a temperatura média, obtendo-se assim a Equação 2. Foi utilizada como temperatura base a temperatura de 10°C (T_b).

$$GD_{10} = (T_{m_{min10}} - T_b) X \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde GD₁₀ é o valor de graus-dia para uma década, T_{m_{min10}} a temperatura mínima média desse mesmo período, T_b a temperatura base de 10°C e X o número de dias do período em causa, neste caso 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maturação da uva

Pela observação dos Quadros 3 e 4 e das Figuras 2, 3, 4 e 5 (a, b, c) constata-se que a maturação da uva se faz de forma diferente de ano para ano. É possível verificar, relativamente ao álcool provável (Quadro 3, Figuras 2 e 4) que o declive da recta de maturação é diferente de talhão para talhão dentro da mesma casta e do mesmo ano, bem como de ano para ano dentro da mesma casta e do mesmo talhão. Se no primeiro caso, se podem considerar diferenças espaciais de talhão para talhão ao nível da fisiografia, da exposição, dos solos, etc., no segundo caso, terão que considerar-se diferenças de âmbito climático inter-anual para explicar as diferenças encontradas.

Quadro 2 – Índices climáticos

| Índice | Descrição |
|-----------------------------|--|
| Temperaturas Mínimas | |
| TNx | Valor máximo absoluto sazonal de temperatura mínima diária |
| TNn | Valor mínimo absoluto sazonal de temperatura mínima diária |
| TN10p | Número de dias sazonais com temperatura mínima diária abaixo do percentil 10 |
| TN35p | Número de dias sazonais com temperatura mínima diária acima do percentil 10 e abaixo do percentil 35 |
| TN65p | Número de dias sazonais com temperatura mínima diária acima do percentil 65 e abaixo do percentil 90 |
| TN90p | Número de dias sazonais com temperatura mínima diária superior ao percentil 90 |
| CSDITN35 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas mínimas inferiores ao percentil 35, definido como ondas de frio |
| WSDITN65 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas mínimas superiores ao percentil 65, definido como ondas de calor |
| WSDITN90 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas mínimas superiores ao percentil 90, definido como ondas de muito calor |
| Temperaturas máximas | |
| TXx | Valor máximo absoluto sazonal de temperatura máxima diária |
| TXn | Valor mínimo absoluto sazonal de temperatura máxima diária |
| TX10p | Número de dias sazonais com temperatura máxima diária abaixo do percentil 10 |
| TX35p | Número de dias sazonais com temperatura máxima diária acima do percentil 10 e abaixo do percentil 35 |
| TX65p | Número de dias sazonais com temperatura máxima diária acima do percentil 65 e abaixo do percentil 90 |
| TX90p | Número de dias sazonais com temperatura máxima diária superior ao percentil 90 |
| CSDITX35 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas máximas inferiores ao percentil 35 |
| WSDITX65 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas máximas superiores ao percentil 65 |
| WSDITX90 | Número máximo consecutivo de dias sazonais com temperaturas máximas superiores ao percentil 90 |

A comparação dos três anos da casta Aragonês no que se refere ao álcool provável (Quadro 3, Figuras 2c, 2d, 2e) permite verificar que o ano de 2007 foi o ano onde a ordenada na origem foi mais baixa, indicando baixos teores de álcool provável no início da monitorização da maturação, por outro lado, 2009 foi o ano onde este valor foi mais elevado, apesar de 2008 ter sido muito parecido a este último. A velocidade de maturação foi bem mais elevada em 2009 e mais baixa em 2008, situando-se 2007 numa posição intermédia. A casta Trincadeira (Quadro 3, Figuras 4c, 4d, 4e) apresentou um comportamento muito semelhante à casta Aragonês neste aspecto.

Quadro 3 – Ordenadas na origem e declives das rectas de maturação relacionadas com os teores de álcool provável.

| | Aragonês | | | | Trincadeira | | | |
|------|------------------------|----------|---------|----------------|-------------|----------|---------|----------------|
| | Talhão | Ordenada | Declive | R ² | Talhão | Ordenada | Declive | R ² |
| | Alcool provável | | | | | | | |
| 2007 | 2C | 6.55 | 0.1447 | 0.96 | 4 | 5.35 | 0.1674 | 0.97 |
| | 2D | 7.61 | 0.1360 | 0.96 | 6 | 5.78 | 0.1735 | 0.96 |
| | 5 | 8.12 | 0.1255 | 0.89 | 7 | 4.71 | 0.2233 | 0.95 |
| | 10 | 6.99 | 0.1886 | 1.00 | 9 | 6.36 | 0.1326 | 0.98 |
| | 12 | 7.62 | 0.1432 | 0.97 | 13 | 5.62 | 0.1458 | 0.98 |
| | 15 | 7.54 | 0.1317 | 0.99 | 14 | 5.88 | 0.1302 | 0.97 |
| | 21 | 6.44 | 0.1232 | 0.97 | - | - | - | - |
| 2008 | 2C | 9.47 | 0.0756 | 0.95 | 4 | 7.95 | 0.1333 | 0.93 |
| | 2D | 8.04 | 0.1145 | 0.94 | 6 | 8.18 | 0.1551 | 0.98 |
| | 5 | 9.25 | 0.1130 | 0.98 | 7 | 8.27 | 0.1410 | 0.97 |
| | 10 | 9.83 | 0.1055 | 0.95 | 9 | 7.10 | 0.2079 | 0.97 |
| | 12 | 9.67 | 0.1256 | 1.00 | 13 | 8.36 | 0.1483 | 0.95 |
| | 15 | 9.87 | 0.1161 | 0.80 | 14 | 9.14 | 0.1211 | 0.88 |
| | 21 | 9.77 | 0.0890 | 0.97 | - | - | - | - |
| 2009 | 2C | 9.43 | 0.1750 | 1.00 | 4 | 8.74 | 0.2451 | 0.95 |
| | 2D | 9.18 | 0.1646 | 0.98 | 6 | 9.12 | 0.2359 | 0.98 |
| | 5 | 9.68 | 0.1816 | 0.96 | 7 | 8.88 | 0.2515 | 0.98 |
| | 10 | 10.12 | 0.1680 | 0.90 | 9 | 9.02 | 0.2272 | 0.94 |
| | 12 | 10.26 | 0.1990 | 0.97 | 13 | 9.32 | 0.2252 | 0.92 |
| | 15 | 10.28 | 0.1568 | 0.91 | 14 | 8.81 | 0.2664 | 1.00 |
| | 21 | 8.99 | 0.2029 | 1.00 | - | - | - | - |

A comparação dos três anos da casta Aragonês no que se refere ao pH (Quadro 4, Figura 3c, 3d, 3e) permite verificar que as diferenças não se fazem sentir tanto ao nível da velocidade de maturação (aumento do pH) mas, especialmente, ao nível do valor de pH de partida. O ano de 2007, com excepção dos talhões 15 e 21, foi o ano onde a ordenada na origem foi a mais baixa, indicando teores de pH mais baixos que os restantes anos, tendo sido o ano de 2009 aquele que apresentou valores de pH mais elevados no

início da monitorização da maturação. A casta Trincadeira (Quadro 4, Figura 5c, 5d, 5e), com pequenas variações, tem um comportamento muito semelhante à casta Aragonês no que respeita à evolução do pH durante a maturação do bago.

Estas diferenças de talhão para talhão dentro da mesma casta e do mesmo ano indicam que a gestão parcelar da vinha pode ter que ser diferente de talhão para talhão, pois, velocidades de maturação diferentes podem originar produtos com qualidades diferentes. Neste tipo de gestão terão, por isso, que procurar-se os factores que, de talhão para talhão, condicionam a maturação da uva, bem como a qualidade do produto final.

Quadro 4 – Ordenadas na origem e declives das rectas de maturação relacionadas com os teores de pH.

| | Aragonês | | | | Trincadeira | | | |
|------|----------|----------|---------|----------------|-------------|----------|---------|----------------|
| | Talhão | Ordenada | Declive | R ² | Talhão | Ordenada | Declive | R ² |
| | pH | | | | | | | |
| 2007 | 2C | 2.62 | 0.0264 | 0.88 | 4 | 2.39 | 0.0290 | 0.84 |
| | 2D | 2.71 | 0.0288 | 0.86 | 6 | 2.41 | 0.0321 | 0.78 |
| | 5 | 2.63 | 0.0266 | 0.74 | 7 | 2.25 | 0.0357 | 0.72 |
| | 10 | 2.79 | 0.0206 | 0.72 | 9 | 2.52 | 0.0260 | 0.79 |
| | 12 | 2.66 | 0.0283 | 0.74 | 13 | 2.39 | 0.0273 | 0.84 |
| | 15 | 3.02 | 0.0156 | 0.95 | 14 | 2.38 | 0.0227 | 0.81 |
| | 21 | 3.03 | 0.0122 | 0.99 | - | - | - | - |
| 2008 | 2C | 3.11 | 0.0183 | 0.98 | 4 | 2.76 | 0.0207 | 0.97 |
| | 2D | 3.13 | 0.0186 | 0.93 | 6 | 3.00 | 0.0154 | 0.80 |
| | 5 | 2.98 | 0.0229 | 0.98 | 7 | 2.69 | 0.0238 | 0.99 |
| | 10 | 2.98 | 0.0206 | 0.93 | 9 | 2.59 | 0.0309 | 0.89 |
| | 12 | 3.12 | 0.0192 | 0.86 | 13 | 2.83 | 0.0223 | 0.91 |
| | 15 | 3.01 | 0.0180 | 0.80 | 14 | 2.90 | 0.0181 | 0.91 |
| | 21 | 3.10 | 0.0186 | 0.95 | - | - | - | - |
| 2009 | 2C | 3.12 | 0.0267 | 1.00 | 4 | 2.96 | 0.0294 | 0.99 |
| | 2D | 3.36 | 0.0193 | 0.98 | 6 | 3.11 | 0.0249 | 0.85 |
| | 5 | 3.24 | 0.0238 | 0.99 | 7 | 3.04 | 0.0280 | 0.98 |
| | 10 | 3.28 | 0.0254 | 0.98 | 9 | 3.08 | 0.0235 | 0.98 |
| | 12 | 3.31 | 0.0231 | 0.98 | 13 | 3.11 | 0.0211 | 0.95 |
| | 15 | 3.26 | 0.0200 | 0.97 | 14 | 2.92 | 0.0314 | 1.00 |
| | 21 | 3.18 | 0.0173 | 0.97 | - | - | - | - |

Do ponto de vista da variação inter-anual, a questão climática, nomeadamente a temperatura, terá que desempenhar aqui uma influência muito forte. Nesse sentido será que se justifica a gestão diferenciada da vinha em função das características climáticas do ano que corre? Um exemplo concreto passa por perceber se taxas de maturação multi-anuais diferentes não necessitarão também de acções diferentes nomeadamente ao nível da rega, da nutrição, etc.?

Índices climáticos

Pela análise dos Quadros 5 e 6 poderão observar-se os diferentes índices climáticos calculados para os 3 anos em estudo. O Quadro 5 apresenta os diferentes índices climáticos para as temperaturas mínimas e o Quadro 6 os diferentes índices climáticos para as temperaturas máximas. Importa notar que alguns dos índices são relativamente homogêneos de ano para ano, no entanto, os índices indicam que o ano de 2009 foi relativamente mais quente que os anos de 2007 e 2008, para além disso, começou a fazer calor na Primavera mais cedo, quando comparado com os dois anos anteriores. O ano de 2009 começou a ter temperaturas mínimas mais altas (vagas de calor consistentes) ainda em Maio, enquanto que nos outros dois anos tal efeito apenas se iniciou em Junho. Esta poderá ser a razão que justifica o facto da maturação em 2009 se ter iniciado e terminado mais cedo.

A observação dos diferentes índices climáticos permitiu considerar que as temperaturas mínimas parecem ser o motor de todo o processo fenológico e maturativo da vinha, por isso, calculou-se o somatório de graus-dia referente a estas temperaturas considerando a Equação 2, tendo-se obtido a Figura 6, para os três anos do estudo.

Pela observação da Figura 6 e pelo cruzamento da informação obtida relativa ao início da vindima, é possível concluir que são necessários aproximadamente 400 °C.dia de temperatura mínima para que os bagos estejam em condições de ser vindimados.

Pela Figura 6 podem inclusive confrontar-se as datas de colheita reais com as datas de colheita previstas utilizando a Equação 2, ao intersectar a curva dos graus-dia do respectivo ano, com a ordenada dos 400°C.dia. As datas de colheita reais coincidiram com as datas de colheita previstas através da Equação 2 e, de um ano para o outro, pode existir quase 1 mês de diferença no início da vindima. Esta relação vem demonstrar que a temperatura mínima acima dos 10°C é um limiar importante a ter em conta na gestão intra e inter-anual da vinha (rega, nutrição, operações culturais, etc.) e, conseqüentemente, na gestão diferenciada dos diferentes factores que contribuem para a qualidade do produto final.

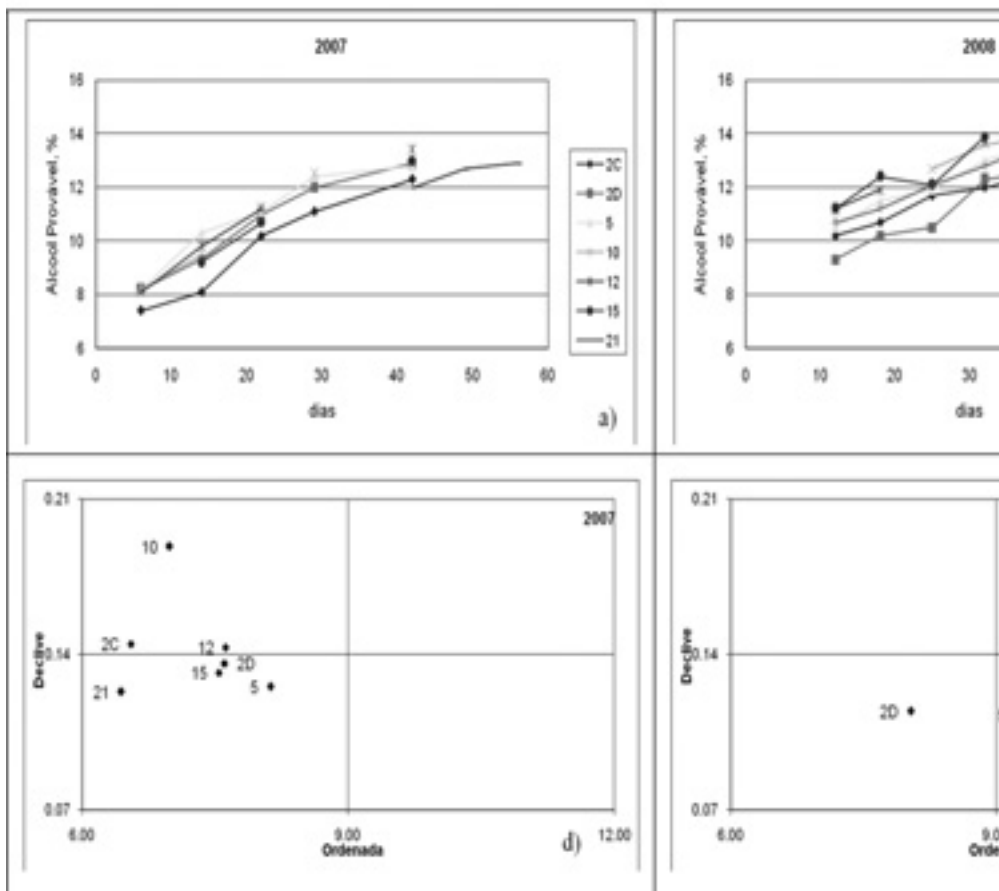
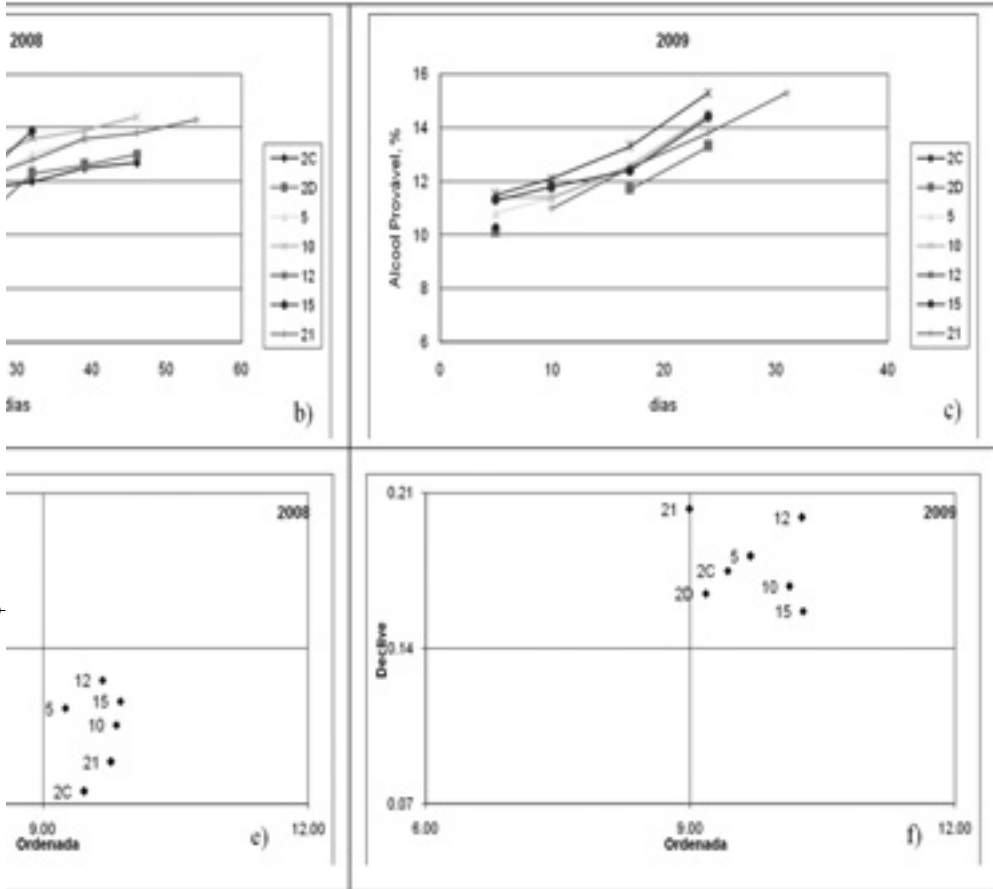


Figura 2 – Evolução do álcool provável da casta Aragonés ao longo da maturação da uva nos anos 2007 (a), 2008 (b) e 2009 (c) nos diferentes talhões estudados. Ordenada na origem e declive das rectas que relacionam o número de dias e o álcool provável da uva (a, b e c) nos anos de 2007 (c), 2008 (d) e 2009 (e) nos diferentes talhões estudados.



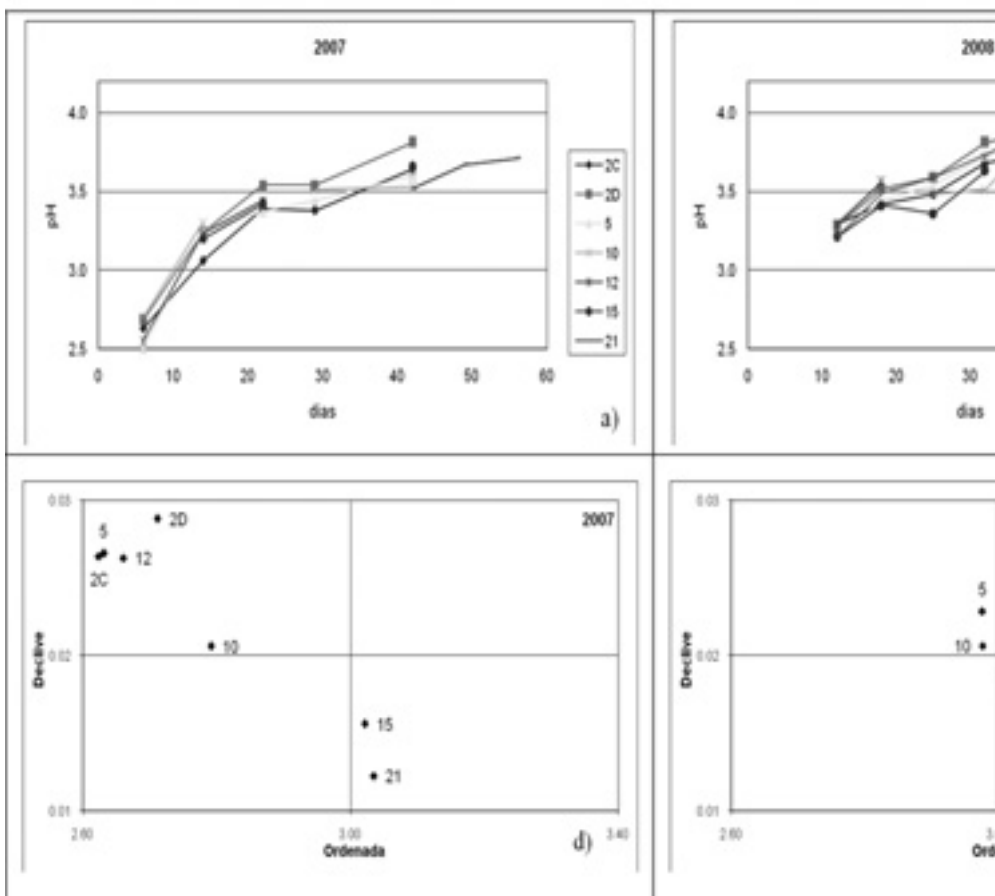
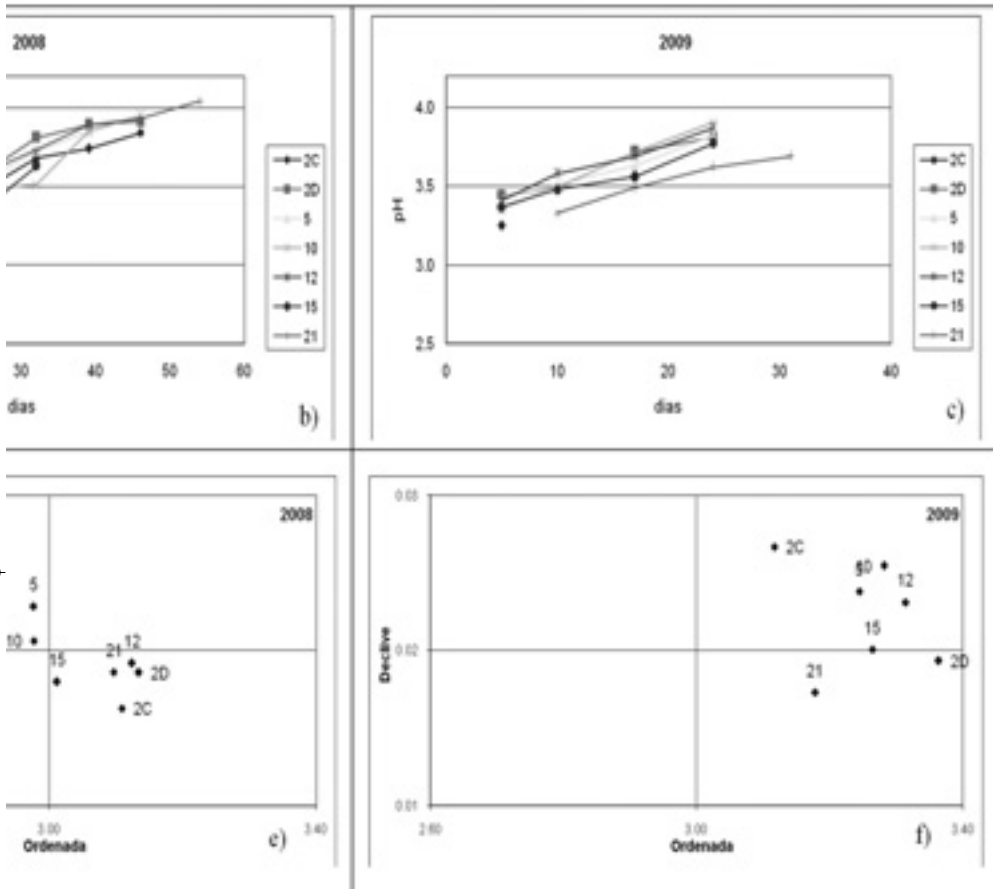


Figura 3 – Evolução do pH da casta Aragonês ao longo da maturação da uva nos anos 2007 (a), 2008 (b) e 2009 (c) nos diferentes talhões estudados. Ordenada na origem e declive das rectas que relacionam o número de dias e o álcool provável da uva (a, b e c) nos anos de 2007 (c), 2008 (d) e 2009 (e) nos diferentes talhões estudados.



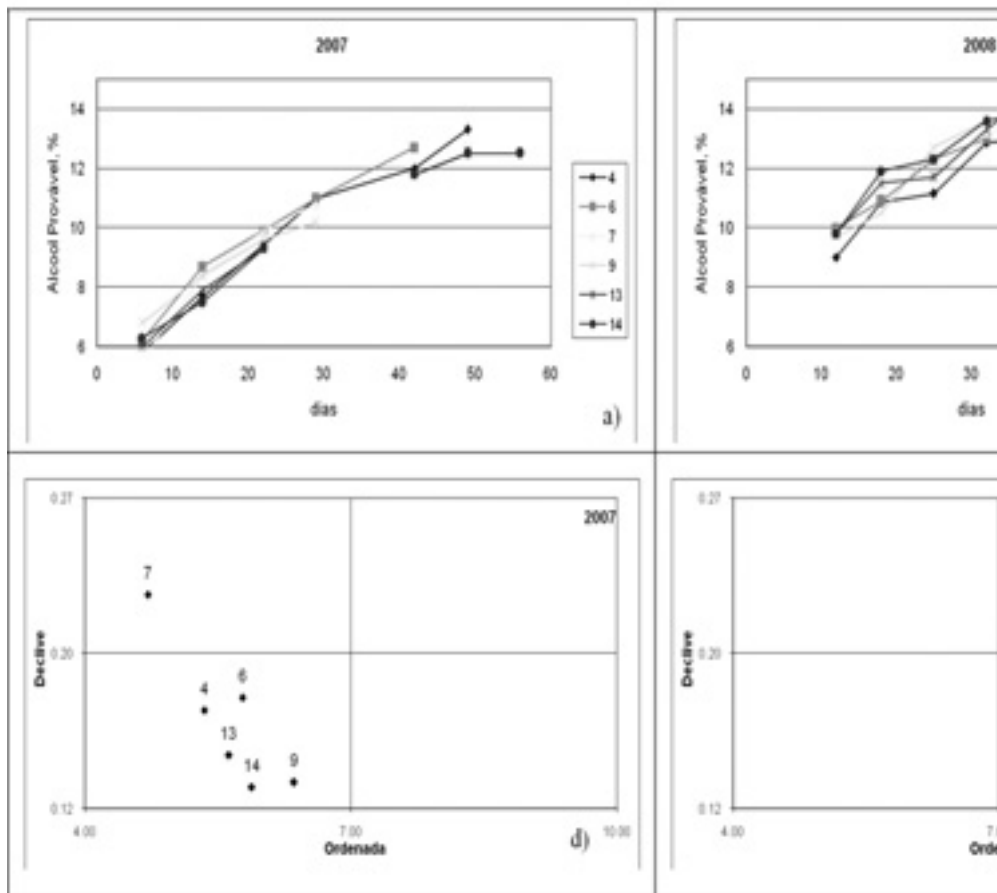
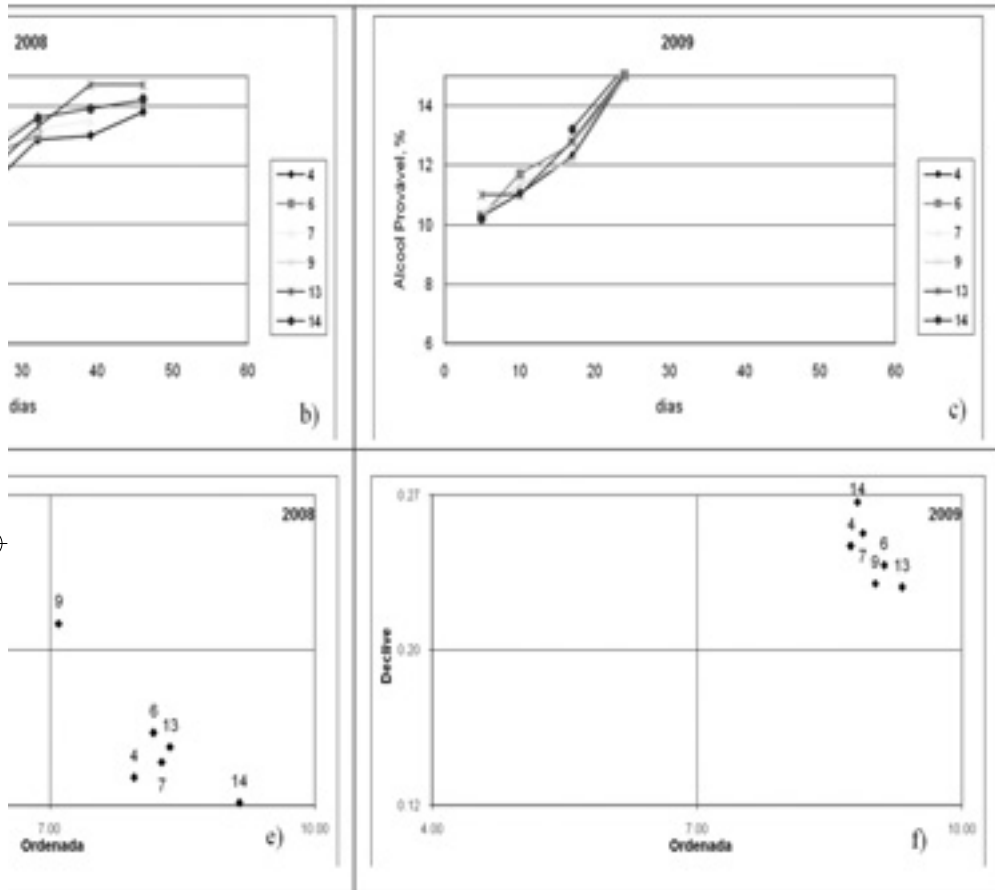


Figura 4 – Evolução do álcool provável da casta Trincadeira ao longo da maturação da uva nos anos 2007 (a), 2008 (b) e 2009 (c) nos diferentes talhões estudados. Ordenada na origem e declive das rectas que relacionam o número de dias e o álcool provável da uva (a, b e c) nos anos de 2007 (c), 2008 (d) e 2009 (e) nos diferentes talhões estudados.



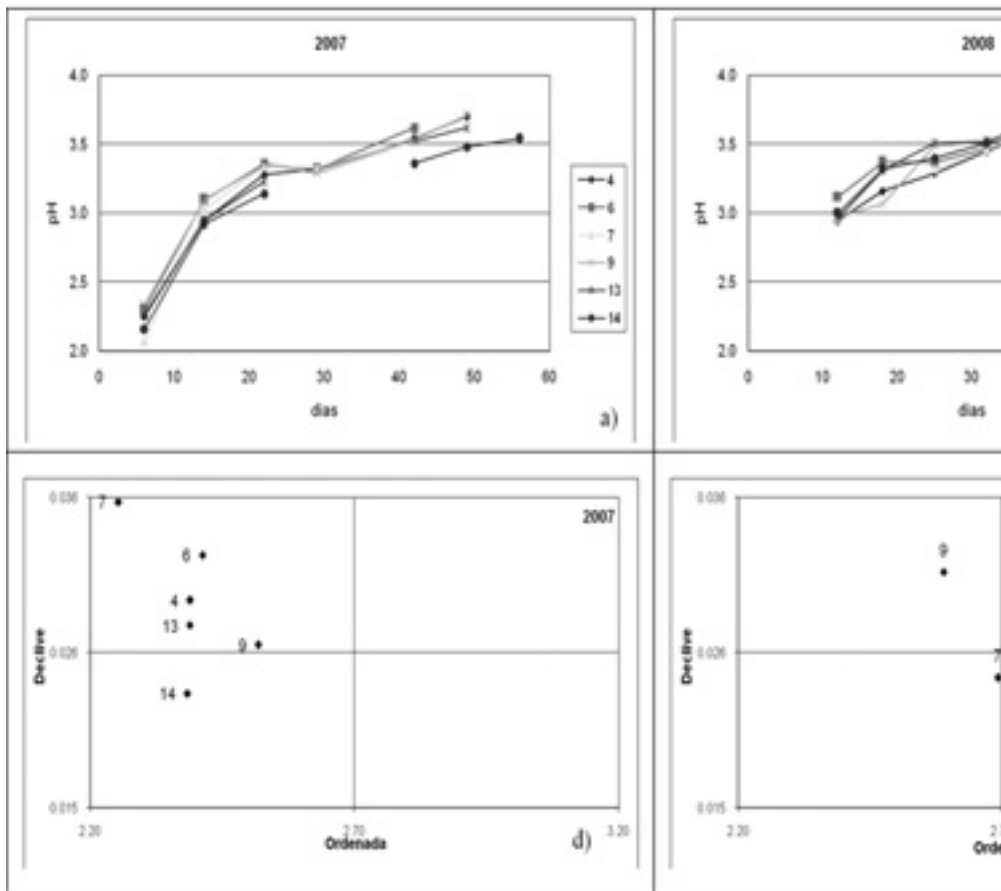
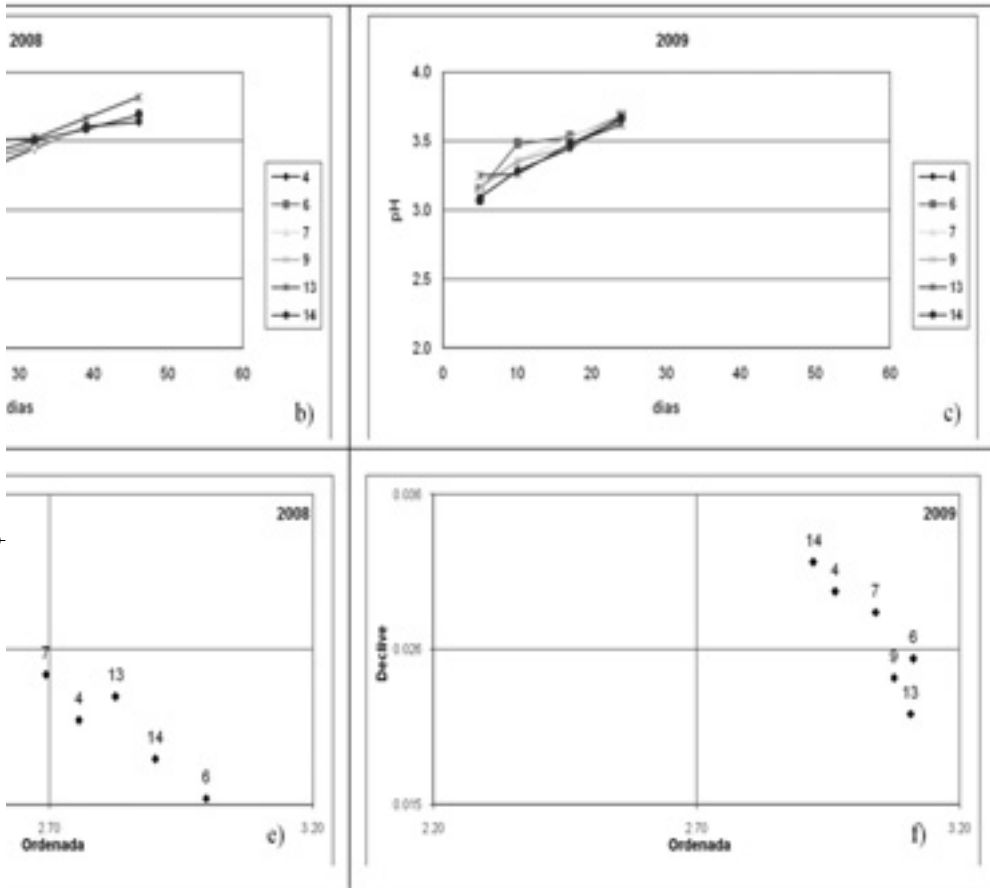


Figura 5 – Evolução do pH da casta Trincadeira ao longo da maturação da uva nos anos 2007 (a), 2008 (b) e 2009 (c) nos diferentes talhões estudados. Ordenada na origem e declive das rectas que relacionam o número de dias e o álcool provável da uva (a, b e c) nos anos de 2007 (c), 2008 (d) e 2009 (e) nos diferentes talhões estudados.



Quadro 5 – Índices climáticos de temperaturas mínimas para os anos de 2007, 2008 e 2009

| | 2007 | | | | | | 2008 | | | | | | 2009 | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|----|---------------------|-------|----------------|-----|--------------------|------------|------------------|------------|---------------------|------------|----------------|-------|--------------------|----|------------------|-------|---------------------|----|----------------|----|--------------------|----|--|
| | nº total de dias | | nº de dias sequenc. | | Data de início | | desv. média padrão | | nº total de dias | | nº de dias sequenc. | | Data de início | | desv. média padrão | | nº total de dias | | nº de dias sequenc. | | Data de início | | desv. média padrão | | |
| | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | TFC | FC | |
| T _{Min} | 22.61 | | | | | | | | 18.62 | | | | | | | | | 22.25 | | | | | | | |
| T _{Min} | -2.98 | | | | | | | -1.26 | | | | | | | | | | -3.5 | | | | | | | |
| T _{Min} 10p | 2.43 | 40 | | | | | | 3.15 | 41 | | | | | | | | | 3.64 | 38 | | | | | | |
| T _{Min} 5p | 6.86 | 93 | | | | | | 7.95 | 88 | | | | | | | | | 7.92 | 92 | | | | | | |
| T _{Min} 0p | 11.88 | 86 | | | | | | 11.89 | 90 | | | | | | | | | 12.36 | 89 | | | | | | |
| T _{Min} 0p | 15.37 | 36 | | | | | | 14.88 | 34 | | | | | | | | | 16.46 | 37 | | | | | | |
| CSOITN35 | 128 | 9 | 06-01-2007 | 3.26 | 1.26 | 126 | 15 | 10-01-2008 | 4.50 | 2.17 | 126 | 15 | 04-01-2009 | 1.68 | 3.17 | | | | | | | | | | |
| | | | 16-01-2007 | 2.57 | 2.23 | | | 26-01-2008 | 3.75 | 1.68 | | | 30-01-2009 | 4.76 | 1.77 | | | | | | | | | | |
| | | | 19-03-2007 | 4.45 | 2.32 | | | 04-02-2008 | 4.96 | 1.07 | | | 10-02-2009 | 4.36 | 1.30 | | | | | | | | | | |
| | | | 01-04-2007 | 4.61 | 1.22 | | | 16-03-2008 | 5.14 | 1.75 | | | 29-03-2009 | 5.18 | 1.30 | | | | | | | | | | |
| | | | 23-11-2007 | 2.90 | 1.28 | | | 12-11-2008 | 2.90 | 2.10 | | | 22-11-2009 | 4.79 | 1.37 | | | | | | | | | | |
| | | | 10-12-2007 | 1.17 | 2.50 | | | 09-12-2008 | 2.79 | 1.90 | | | 08-12-2009 | 2.83 | 3.55 | | | | | | | | | | |
| | | | 22-12-2007 | 2.74 | 1.68 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSOITN65 | 122 | 19 | 01-07-2007 | 14.54 | 1.53 | 124 | 11 | 07-06-2008 | 13.38 | 1.34 | 126 | 8 | 29-05-2009 | 13.52 | 0.46 | | | | | | | | | | |
| | | | 23-07-2007 | 15.98 | 2.96 | | | 20-06-2008 | 15.12 | 1.49 | | | 11-06-2009 | 17.22 | 1.71 | | | | | | | | | | |
| | | | 15-08-2007 | 14.60 | 1.42 | | | 08-07-2008 | 14.59 | 1.79 | | | 28-06-2009 | 15.65 | 1.30 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 10-10-2008 | 12.82 | 1.02 | | | 04-08-2009 | 16.65 | 2.41 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | 21-09-2009 | 14.76 | 1.57 | | | | | | | | | | |
| WSOITN90 | 36 | 4 | 04-07-2007 | 16.36 | 0.75 | 34 | 8 | 16-07-2008 | 16.66 | 1.43 | 37 | 4 | 13-06-2009 | 18.05 | 1.34 | | | | | | | | | | |
| | | | 03-08-2007 | 16.58 | 0.48 | | | 02-08-2008 | 16.03 | 0.73 | | | 18-06-2009 | 18.21 | 1.35 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | 11-08-2009 | | | 19.18 | 1.57 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 08-09-2009 | 18.80 | 1.06 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | 2009 | 18.80 | 1.06 | | | | | | | | | | |

Quadro 6 – Índices climáticos de temperaturas máximas para os anos de 2007, 2008 e 2009

| | 2007 | | | | | | 2008 | | | | | | 2009 | | | | | | | |
|-----------------|------------------|-----|---------------------|------------|----------------|------|-------|-----|-------------|------------|------------------|------|---------------------|-----|----------------|------------|--------|-------|-------------|--|
| | nº total de dias | | nº de dias sequenc. | | Data de início | | média | | dev. padrão | | nº total de dias | | nº de dias sequenc. | | Data de início | | média | | dev. padrão | |
| | °FC | | | | °C | °C | °FC | | | | °FC | | | | °C | °C | °FC | | | |
| T _{ix} | 40.99 | | | | | | 18.66 | | | | 18.66 | | | | | | 18.66 | | | |
| T _{ix} | 6.7 | | | | | | 8.73 | | | | 8.73 | | | | | | 8.73 | | | |
| TR10p | 13.67 | 46 | | | | | 13.51 | 37 | | | 13.51 | 37 | | | | | 12.36 | 38 | | |
| TR35p | 17.49 | 88 | | | | | 17.36 | 92 | | | 17.36 | 92 | | | | | 18.205 | 90 | | |
| TR65p | 25.01 | 85 | | | | | 25.01 | 88 | | | 25.01 | 88 | | | | | 27.07 | 90 | | |
| TR90p | 31.41 | 36 | | | | | 31.94 | 37 | | | 31.94 | 37 | | | | | 34.26 | 37 | | |
| CSOITX35 | | 134 | 18 | 01-01-2007 | 14.06 | 1.90 | | 123 | 18 | 01-01-2008 | 13.71 | 1.41 | | 128 | 52 | 01-01-2009 | 12.397 | 2.785 | | |
| | | | | 21-01-2007 | 13.31 | 2.73 | | | | 24-11-2008 | 12.47 | 2.00 | | | | 26-02-2009 | 14.877 | 1.848 | | |
| | | | | 13-2007 | 15.54 | 1.38 | | | | 9-2008 | 12.73 | 1.96 | | | | 9-2009 | 13.85 | 2.725 | | |
| | | | | 19-11-2007 | 14.27 | 1.44 | | | | | | | | | | 40-2009 | | | | |
| WSOITX65 | | 121 | 78 | 26-06-2007 | 31.38 | 3.51 | | 125 | 86 | 17-06-2008 | 31.44 | 3.28 | | 127 | 15 | 10-06-2009 | 31.937 | 3.716 | | |
| | | | | | | | | | | 13-09-2008 | 29.09 | 2.68 | | | | 07-07-2009 | 31.38 | 1.884 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 18-07-2009 | 33.451 | 2.883 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 02-08-2009 | 34.047 | 3.107 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 20-09-2009 | 29.52 | 1.006 | | | |
| WSOITX90 | | 36 | 5 | 10-07-2007 | 34.21 | 1.34 | | 37 | 4 | 19-06-2008 | 33.38 | 0.99 | | 37 | 5 | 17-06-2009 | 36.336 | 1.276 | | |
| | | | | 25-07-2007 | 36.84 | 3.31 | | | | 25-06-2008 | 35.29 | 1.08 | | | | 10-08-2009 | 37.058 | 0.894 | | |
| | | | | | | | | | | 7-2008 | 35.29 | 1.08 | | | | 14-07-2009 | 37.13 | 1.511 | | |
| | | | | | | | | | | 6-2008 | 35.24 | 1.65 | | | | 27-08-2009 | | | | |
| | | | | | | | | | | 02-08-2008 | 36.80 | 2.01 | | | | 06-09-2009 | | | | |
| | | | | | | | | | | 5-2008 | 33.47 | 0.45 | | | | 4-2009 | 35.235 | 0.512 | | |

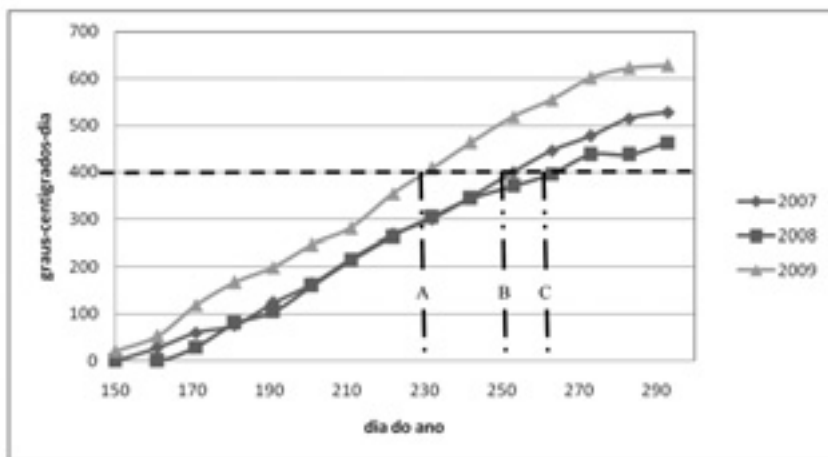


Figura 6 – Graus-dia cumulativos de temperaturas mínimas para os anos de 2007, 2008 e 2009 (foram apenas consideradas as décadas que apresentavam valores de DD_{10} positivos). A) Colheita em 2009; B) Colheita em 2007 e C) Colheita em 2008.

CONCLUSÕES:

Este estudo demonstrou que a variabilidade espacial e temporal na maturação da uva dentro da mesma casta é uma realidade. Tal variabilidade (espacial e inter-anual), abre a possibilidade de uma gestão diferenciada dos factores de produção, nomeadamente da rega, da fertilização, das operações culturais, etc, bem como, a gestão diferenciada da colheita com o objectivo de colher produtos com diferentes tipos de qualidade e valor associado.

Este estudo também demonstrou que a temperatura do ar é um factor importantíssimo no crescimento fenológico e na maturação da videira, podendo-se estimar a data óptima de colheita em função do número de graus-dia de temperatura mínima (considerando uma temperatura base de 10°C). Os resultados obtidos permitem indicar que, para estas castas e para estas condições edafo-climáticas a data óptima de colheita está associada a aproximadamente $400^{\circ}\text{C}\cdot\text{dia}$.

Trabalhos futuros deverão explorar os efeitos da temperatura não só na taxa de maturação do bago mas também na qualidade do mesmo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Eugénio de Almeida pela disponibilidade dos espaços, pelo apoio logístico e pelos dados fornecidos e de uma forma especial aos Eng. Pedro Baptista, Eng. Ana Simões, Eng. João Torres e Eng. Mariana Torres pela forma sempre prestável como se envolveram neste trabalho.

Ao Eng. João Roma, ao Sr. Custódio e ao Sr. Condeças pela forma como resolveram as diferentes situações de campo.

REFERÊNCIAS:

- Amerine, M.A. & A.J. Winkler (1944). Composition and quality of musts and wines of California grapes. *Hilgardia*, **16** (6): 493-675.
- Archer, E. & H.C. Strauss (1990). The effect of vine spacing on some physiological aspects of *Vitis vinifera* L. (cv. Pinot noir). *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **11** (2), 76-87.
- Bradfield, M. & N. Stamp (2004). Effect of nighttime temperature on tomato plant defensive chemistry. *Journal of Chemical Ecology*, **30** (9): 1713-1721.
- Crippen, JR. & J.C. Morrison (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabemet Sauvignon berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37** (4), 235-241.
- Fletcher, R.S., T. Slimmon, C.Y. McAuley & L.S. Kott (2005). Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85** (14): 2429-2436.
- Godoy, C., H. Garza & M.V. Huitrón (1998). Crecimiento y acumulación de azúcares en el fruto de la vid (*Vitis vinifera* L.) bajo diferentes condiciones hídricas. *ITEA*, **94V** (3), 129-137.
- Harris, J.M., P.E. Kriedemann & J.V. Possingham (1968). Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis*, **7**, 106-109.
- Kliewer, W.M. & R.E. Torres (1972). Effect of Controlled Day and Night Temperatures on Grape Coloration. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23** (2): 71-77.
- Matthews, M.A., M.M. Anderson & H.R. Schultz (1987). Phenological and growth responses to early and late season deficits in Cabernet franc. *Vitis* **26**, 147-160.

- Mori, K., S. Sugaya & H. Gemma (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, **105** (3): 319-330.
- Prescott, A.J. (1969). The climatology of the vine (*Vitis Vinifera* L) 3. A comparison of France and Australia on the basis of the warmest month. *Transactions of the Royal Society of South Australia*. **93**: 7-15.
- Spayd, S.E., J.M. Tarara, D.L. Mee & J.C. Ferguson (2002). Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53** (3): 171-182.
- Tank, A., M.G. Klein, & F.W. Zwiers (2009). Guidelines on - Analysis of extremes in a changing climate in support of informed decisions for adaptation. World Meteorological Organization (WMO)
- Wang, S.Y. & W. Zheng (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (10): 4977-4982.
- Winkler, A.J., J. Cook, W. Kliewer & L. Lider (1974). *General viticulture*. University of California Press, Berkeley.
- Yamane, T., S.T. Jeong, N. Goto-Yamamoto, Y. Koshita & S. Kobayashi (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (1): 54-59.

A CROMATOGRAFIA GASOSA–OLFACTOMETRIA NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EM VINHOS

Goreti BOTELHO^{1,2}; Maria Cristina CLÍMACO³

RESUMO

O aroma de um vinho tem origem num considerável número de compostos químicos voláteis que existem numa vasta gama de concentrações (inferior a 1 ng/L a superior a 100 mg/L). Actualmente, constitui um grande desafio para a investigação a identificação e a quantificação dos compostos voláteis odorantes, que são determinantes para o perfil de aroma e a qualidade dos vinhos.

Uma das técnicas analíticas mais utilizada é a cromatografia em fase gasosa com detecção olfactométrica (GC-O). Esta técnica baseia-se na avaliação sensorial olfactiva do efluente de uma coluna cromatográfica procurando determinar quais os compostos voláteis com actividade odorante.

Neste trabalho apresenta-se os contributos da GC-O na caracterização do aroma e na avaliação da qualidade em vinhos produzidos com uvas de diferentes castas e com diversas tecnologias de fabrico.

Palavras-chave: Aromas em vinhos, compostos odorantes, Cromatografia Gasosa–Olfactometria, qualidade.

1 – INTRODUÇÃO

Ainda hoje se conhece pouco sobre os mecanismos segundo os quais os seres humanos têm a percepção do sabor e do odor.

Os estudos sobre aromas nos produtos alimentares surgiram com o advento da cromatografia em fase gasosa no início dos anos cinquenta. Inicialmente a investigação em aromas baseava-se no pressuposto de que todos os constituintes voláteis existentes no alimento contribuía para o seu aroma.

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentar, Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra. Portugal. goreti@esac.pt

²CEA - CERNAS – Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade, Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra. Portugal.

³INIA - Dois Portos, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P., Quinta da Almoíña, 2565-191 Dois Portos. Portugal. evn.mcclimaco@mail.net4b.pt

A introdução da análise olfactiva do efluente da coluna cromatográfica por FULLER *et al.* (1964), utilizando o nariz humano como um detector, constituiu um grande avanço na percepção de que nem todos os constituintes voláteis existentes num alimento contribuem para o seu aroma, mas apenas os que possuem actividade odorante.

Posteriormente, autores como DRAVNIK e O'DONNELL (1971), ACREE *et al.* (1976) sugeriram a introdução de um fluxo de ar húmido na saída aquecida do efluente da coluna cromatográfica e criaram as bases da Cromatografia Gasosa-Olfactometria (GC-O, de *Gas Chromatography-Olfactometry*).

Pretende-se neste trabalho avaliar os contributos das diferentes metodologias de GC-O para o conhecimento dos compostos que são odorantes activos e contribuem efectivamente para o aroma dos vinhos.

2 – METODOLOGIAS DE GC-O

De acordo com ACREE e BANARD (1994) pode-se classificar as técnicas que foram desenvolvidas para avaliar, por GC-O, a contribuição sensorial de um simples composto com actividade odorante nas seguintes categorias de métodos: de diluição, de tempo- intensidade, de frequência de detecção e de intensidade posterior.

A *CharmAnalysis*TM desenvolvida por ACREE *et al.* (1984a,b) e a *Aroma Extract Dilution Analysis* (AEDA) desenvolvida por SCHIEBERLE e GROSCH (1987a,b) e ULLRICH e GROSCH (1987) são métodos de diluição que se baseiam em diluições sucessivas até ao limiar de percepção proporcionando a determinação da potência odorante. A *Odor Specific Magnitude Estimation* (OSME) desenvolvida por McDANIEL *et al.* (1990) e MIRANDA-LÓPEZ *et al.* (1992a,b) é um método de tempo-intensidade que se baseia na produção de estimativas de intensidade odorífera percebida e registada simultaneamente com a eluição do pico cromatográfico. A *Olfactometric Global Analysis* (OGA) é um método de frequência de detecção desenvolvido por LINSSEN *et al.* (1993) que se baseia no registo dos odores detectados por um grupo de *sniffers*. Neste método, o número de *sniffers* que detectam um odor é utilizado como uma estimativa da intensidade de odor. Os métodos de intensidade posterior foram desenvolvidos por PETERSEN *et al.* (1998) e TØNDER *et al.* (1998) e baseiam-se na estimativa da intensidade percebida e registada após eluição do pico cromatográfico.

Em Portugal, os primeiros trabalhos científicos publicados utilizando alguns dos métodos referidos, foram realizados por CALDEIRA *et al.* (2004) centrando o estudo nos compostos odorantes-chave em vinhos e aguardentes por frequência de detecção, enquanto BOTELHO *et al.* (2007) compararam o método de intensidade posterior com o de frequência de detecção na avaliação de odorantes-chave em vinhos monoclonais.

3 – AROMAS EM VINHOS

3.1 – Caracterização de aromas varietais

O vinho é sem dúvida a bebida alcoólica em que se desenvolveram mais estudos sobre aromas por metodologias de GC-O.

No que se refere à caracterização dos aromas varietais salienta-se, na casta Chardonnay o estudo por *CharmAnalysis*TM de MOIO *et al.* (1994), que determina como odorantes activos: vanilina, 2,3-butadiona, guaiacol, 4-vinil-guaiacol e cinamato de etilo; na casta Gewürztraminer os estudos por AEDA de GUTH (1997a,b) e por *CharmAnalysis*TM de ONG e ACREE (1999) determinaram como odorante-chave o óxido *cis*-rosa; na casta Schreube os trabalhos por AEDA de GUTH (1997a,b) identificaram como odorante-chave 4-mercapto-4-metil-2-pentanona, na casta Pinot Noir os estudos de MIRANDA-LOPEZ *et al.* (1992a,b) e MOIO e ETIEVANT (1995) demonstram que os odorantes activos são antranilato de etilo, cinamato de etilo, 2,3-dihidróxi-cinamato de etilo e antranilato de metilo; na casta Grenache o trabalho de FERREIRA *et al.* (1998) evidencia a importância dos ésteres etílicos dos ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metilbutírico. LOPEZ *et al.* (1999), num estudo comparativo dos compostos com impacto odorante das castas Merlot, Cabernet Sauvignon e Grenache, afirmam que à excepção das metoxi-pirazinas, os odorantes mais activos desses vinhos tintos são produtos secundários da fermentação alcoólica presentes em todos os vinhos, pelo que as diferenças entre castas são essencialmente quantitativas.

No que se refere a castas portuguesas pode-se destacar o estudo realizado por CAMPO *et al.* (2006) que permitiu verificar que as castas brancas Malvazia, Boal, Verdelho e Sercial, cultivadas na ilha da Madeira, são pobres na maioria dos constituintes do aroma varietal, como monoterpenóis e metoxi-pirazinas e constatar a extrema complexidade do aroma dos vinhos Madeira, tendo detectado numerosos odorantes desco-

nhecidos específicos destes vinhos. A casta Touriga Nacional foi estudada por FALCO (2004) por *CharmAnalysis*TM, tendo observado como odorantes mais importantes: β -damascenona, sotolon, 2-feniletanol, linalol e vanilato de etilo. BOTELHO (2008) e BOTELHO *et al.* (2007, 2008) caracterizaram, pelo método de intensidade posterior, o aroma de vinhos de clones das castas Aragonez e Trincadeira, e concluíram que o aroma dos vinhos de ambas, é fortemente influenciado por 2-fenil-etanol, β -damascenona e 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(H)-furanona (furaneol).

Os compostos furaneol e homofuraneol, caracterizados com os descritores de odor a açúcar queimado (tipo caramelo) e algodão doce, identificados nos vinhos clonais de Aragonez e Trincadeira, foram também identificados nas fracções livres e ligadas glicosidicamente dos mostos de Aragonez, indicando a sua origem varietal BOTELHO *et al.* (2010).

3.2 – Caracterização de defeitos de aroma

Um objectivo importante dos estudos por GC-O dos constituintes com impacto no aroma de vinhos e uvas é a determinação dos compostos responsáveis por defeitos de aroma.

Segundo o trabalho de DARRIET *et al.* (2000) o aroma terroso pode aparecer nos vinhos devido à presença de geosmina nas uvas podres (*Brotrytis cinerea*) ou derivado da rolha de cortiça. La GUERCHE *et al.* (2006) determinaram igualmente a presença de aroma terroso, provocado pela existência de geosmina e de aroma a cogumelos/fungos devido à presença de 1-octeno-3-ol em uvas infectadas com podridão e respectivos vinhos.

Outros autores centraram o seu estudo na identificação dos compostos odorantes responsáveis por defeitos associados à oxidação indesejável de vinhos brancos ESCUDERO *et al.* (2000a); FERREIRA *et al.* (2003b), tendo associado os aromas a batatas cozidas e a caril com a presença, respectivamente, de 3-metil-tio-propanal e sotolon.

3.3 – Caracterização das incidências das tecnologias enológicas no aroma

Além dos vinhos tranquilos, tintos ou brancos, também outros vinhos, vulgarmente designados de “vinhos especiais”, têm sido alvo de estudos por GC-O.

ESCUADERO *et al.* (2000b) realizaram um estudo com o objectivo de caracterizar vinhos champanhe por GC-O. Recentemente, os investigadores CAMPO *et al.* (2008) estudaram vinhos licorosos e espumantes produzidos em Espanha, tendo verificado que a origem da formação dos componentes do aroma derivados das tecnologias de fabrico são a esterificação dos ácidos gordos derivados dos aminoácidos e a oxidação dos diferentes precursores.

Os diferentes métodos de GC-O têm sido utilizados não apenas para caracterizar o perfil do aroma de um vinho, mas para procurar compostos odorantes específicos que podem apresentar semelhanças com uma determinada característica de aroma num vinho. Salienta-se no vinho do Porto o trabalho de ROGERSON *et al.* (2001) e em vinhos licorosos da casta Grenache os de SCHNEIDER *et al.* (1998). Pode-se destacar também a identificação de sotolon enquanto responsável pelas notas de aroma a especiarias e caril dos vinhos Sherry MARTIN *et al.* (1992) e Porto FERREIRA *et al.* (2003a).

4 - CONCLUSÕES

A introdução das metodologias de Cromatografia Gasosa-Olfactometria aliada à utilização de metodologias cada vez mais eficientes de separação e identificação química, permitem a obtenção de um conhecimento aprofundado de quais são os compostos com impacto no aroma e qual o contributo individual para a enorme complexidade do aroma dos vinhos.

Os caminhos de futuro na avaliação da qualidade nos vinhos apontam para a utilização das metodologias de GC-O, complementadas com estudos de análise sensorial, conducentes à determinação de como se formam as percepções olfactivas em misturas complexas.

O conhecimento dos compostos com impacto no aroma, que são característicos de diversas castas, que são formados ou transformados pelas diversas tecnologias de fabrico dos vinhos e/ou estão na origem de defeitos, são factores fundamentais na produção de vinhos de qualidade, ao proporcionar uma selecção criteriosa das castas e das tecnologias vitícolas e enológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACREE T. E., BARNARD J., (1994). Gas Chromatography-olfactometry and CharmAnalysis™. *In: Trends in Flavour Research*. 211-220. Maarse H., van der Heij D.G. (ed.), Elsevier, Amsterdam.
- ACREE T. E., BARNARD J., CUNNINGHAM D. G., (1984a). A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.*, **14**, 273-286.
- ACREE T. E., BARNARD J., CUNNINGHAM D. G., (1984b). The analysis of odor-active volatiles in gas chromatographic effluents. *In: Analysis of volatiles: methods and applications*. Schreier P. (ed.), pg. 251-267. Walter de Gruyter. Berlin.
- ACREE, T. E., BUTTS, R. M., NELSON, R. R.; LEE, C. Y., (1976). Sniffer to determine the odor of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.*, **48**, 1821-1822.
- BOTELHO G., (2008). *Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonéz and Trincadeira Vitis vinifera L. Cultivars*. 169 p. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- BOTELHO G., MENDES-FAIA A., CLÍMACO M. C., (2007). Evaluation of two quantitative gas chromatography-olfactometry methods for clonal red wines differentiation. *Flavour Fragr. J.* **22**, 414-420.
- BOTELHO G., MENDES-FAIA A., CLÍMACO M. C., (2008). Differences in odor-active compounds of Trincadeira wines obtained from five different clones. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 7393-7398.
- BOTELHO G., MENDES-FAIA A., CLÍMACO M. C., (2010). Characterisation of free and glycosidically bound odourant compounds of Aragonéz clonal musts by GC-O. *Anal. Chim. Acta*, **657**, 198-203.
- CALDEIRA I., BOTELHO G., BELCHIOR A.P., SOUSA R.B., FAIA A.M, CLÍMACO M.C., (2004). Aplicação da cromatografia em fase gasosa – olfactometria no conhecimento dos odorantes-chave em vinhos e aguardentes. *In: 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, vol. 2, 114-120, Évora. Portugal.
- CAMPO E., CACHO J., FERREIRA V., (2008). The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chro-

- matography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2477-2484.
- CAMPO E., FERREIRA V., ESCUDERO A., MARQUES J. C., CACHO J., (2006). Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Anal. Chim. Acta*, **563** (1-2), 180-187.
- DARRIET, P., PONS, M., LAMY, S., DUBORDIEAU, D., (2000). Identification and quantification of geosmine, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4835-4838.
- DRAVNIK A. O'DONNELL A., (1971). Principles and some techniques of high-resolution head-space analysis, *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1049-1056.
- ESCUDERO A., CACHO J., FERREIRA, V. (2000a). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography-olfactometric study. *Eur. Food Res. Technol.*, 211, 105-110.
- ESCUDERO A., CHARPENTIER M.; ETIÉVANT P. X. (2000b). Characterization of aged champagne wine aroma by GC-O and descriptive profile analyses. *Sci. Aliments*, **20**, 331-346.
- FALCO, V. (2004). *Caracterização do aroma de vinhos da Vitis vinifera L. var. Touriga Nacional*. 179 p. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- FERREIRA A. C. S., BARBE J. C., BERTRAND A. (2003a). 3-Hydroxy-4,5- dimethyl-2(5H)-furanone: A key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4356-4363.
- FERREIRA A. C. S., HOGG T., GUEDES DE PINHO P. (2003b). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1377-1381.
- FERREIRA V., LÓPEZ R., ESCUDERO A., CACHO J. F. (1998). The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *J. Sci. Food Agric.*, **77**, 259-267.
- FULLER G.H., STELTENKAMP, R., TISSERAND, G.A. (1964). The gas chromatograph with human sensor: perfumer model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 711-724.
- GUTH H. (1997a). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3022-3026.

- GUTH H. (1997b). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3027-3032.
- La GUERCHE S., DAUPHIN B., PONS M., BLANCARD D., DARRIET P. (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9193-9200.
- LINSEN J. P. H., JANSSENS J. L. G. M., ROOZEN J. P., POSTHUMUS M. A. (1993). Combined gas chromatography and sniffing port analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. *Food Chem.*, **46**: 367-371.
- LÓPEZ R., FERREIRA V., HERNÁNDEZ P, CACHO J. F. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon, and Grenache grape varieties: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1461-1467.
- MARTIN B.; ETIÉVANT P. X.; LEQUERE J. L.; SCHLICH, P. (1992). More clues about sensory impact of sotolon in some flor Sherry wines. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 475-478.
- McDANIEL M. R., MIRANDA-LOPEZ R., WATSON B. T., MICHAELS N. J., LIBBEY L. M., (1990). Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. *In: Flavors and off-flavors, Proceedings of the 6th International Flavor Conference*. Rethymnon, Crete, Greece 5-7 July 1989 (G. Charambous, eds), pg. 23-36. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- MIRANDA-LÓPEZ R., LIBBEY L. M., WATSON B. T., McDANIEL M. R. (1992a). Identification of additional odor-active compounds in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 90-92.
- MIRANDA-LÓPEZ R., LIBBEY L. M., WATSON B. T., McDANIEL M. R. (1992b). Odor analysis of Pinot noir wines from grapes of different maturities by a gas chromatography-olfactometry technique (osme). *J. Food Sci.*, **57**, 985-993.
- MOIO L., ETIÉVANT P. X. (1995). Ethyl anthranilate, ethyl cinnamate, 2,3-dihydrocinnamate, and methyl anthranilate: four important odorants identified in Pinot noir Wines of Burgundy. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 392-397.
- MOIO L., SCHLICH P., ETIÉVANT P. (1994). Acquisition et analyse d'aromagrammes de vins de Bourgogne issus du cépage Chardonnay (Acquisition and analysis of aromagrams of Chardonnay Burgundy wines). *Sci. Alim.*, **14**, 601-608.

- ONG P. K. C., ACREE T. E. (1999). Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and Lychee (*Litchi chinesis Sonn.*) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 665-670.
- PETERSEN M. A., POLL L., LARSEN L. M. (1998). Comparison of volatiles in raw and boiled potatoes using a mild extraction technique combined with GC odour profiling and GC-MS. *Food Chem.*, **61**(4), 461-466.
- ROGERSON F. S. S., CASTRO H.; FORTUNATO N., AZEVEDO Z., MACEDO A., FREITAS V. A. P. (2001). Chemicals with sweet aroma descriptors found in Portuguese wines from the Douro region: 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione and diacetyl. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 263-269.
- SCHIEBERLE P., GROSCH W. (1987a). Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **185**, 111-113.
- SCHIEBERLE P., GROSCH W. (1987b). Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 252-257.
- SCHNEIDER R., BAUMES, R. BAYONOVE C., RAZUNGLES A. (1998). A. Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache noir. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3230-3237.
- TØNDER D., PETERSEN M. A., POLL L., OLSEN C. E. (1998). Discrimination between freshly made and stored reconstituted orange juice using GC Odour profiling and aroma values. *Food Chem.*, **61**, 223-229.
- ULLRICH F., GROSCH, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **184**, 277-282.



OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CASTAS DE *VITIS VINIFERA* L. MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*

Hélia CARDOSO¹; Aladje BALDÉ²; Andreia FIGUEIREDO²; Augusto PEIXE³ e Maria S. PAIS²

RESUMO

A obtenção de um sistema eficiente para a selecção de plantas putativamente transformadas e a definição das condições óptimas inerentes ao processo de transformação constituem dois pré-requisitos para o sucesso da transformação genética de plantas. A determinação prévia da concentração do agente selectivo pode revelar-se um factor crítico na obtenção de tecidos, órgãos ou organismos putativamente transformados. No presente trabalho foi avaliado o efeito da concentração do antibiótico canamicina na selecção de transformantes das castas Trincadeira e Aragonez de *V. vinifera* tendo-se seleccionado a concentração de 40 mg/L. Para otimizar o protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* desenvolveram-se os primeiros trabalhos para selecção da estirpe bacteriana. De entre as quatro estirpes analisadas, apenas *calli* co-cultivados com as estirpes LBA4404 e LBA2915 apresentaram expressão transiente do gene *gus*. A amplificação dos genes *reporter* e de selecção foi obtida exclusivamente a partir de uma planta de Aragonez obtida de *calli* co-cultivados com a estirpe LBA4404. O efeito da presença de acetosiringona (100 mg/L) durante o período de incubação e co-cultura com *A. tumefaciens* foi também avaliado revelando-se a sua presença associada a um aumento notório da expressão transiente do gene *gus* em *calli* embriogénicos de ambas as castas.

PALAVRAS-CHAVE: *Agrobacterium*, embriogénese somática, *gus*, *Vitis*.

1. INTRODUÇÃO

As castas *V. vinifera* Trincadeira e Aragonez são duas das mais importantes para produção de vinhos tintos de elevada qualidade em Portugal, em particular na região do Alentejo. No entanto, como todas as castas europeias também estas apresentam elevada

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ICAAM – Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal, Email: heliacardoso@gmail.com

² Unidade de Biologia Molecular e Biotecnologia de Plantas, BioFIG, Ed. ICAT - Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

³ Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas, ICAAM - Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal.

susceptibilidade aos fungos de podridão, o que potencia elevadas quebras na produção e consequentemente graves prejuízos económicos em anos propícios ao desenvolvimento desses fungos. Perante este cenário o melhoramento destas castas possui grande interesse e é neste sentido que a biotecnologia apresenta um papel importante ao permitir, através de técnicas de engenharia genética, a introdução de resistência aos fungos sem alterar qualquer outra característica específica da casta. Com o objectivo de ulterior introdução de genes relacionados com a resistência a fungos iniciou-se um trabalho com o objectivo de desenvolver um protocolo de transformação genética de ambas as castas mediada por *A. tumefaciens*. Este método é considerado o método de eleição para a transferência de genes numa diversidade de espécies vegetais. Os primeiros relatos de transformação genética de videira utilizando este método devem-se a Hemstad e Reisch (1985), ainda que a regeneração de plantas transgénicas seja referida apenas em 1990 por Mullins *et al.* Actualmente são diversas as referências à aplicação desta metodologia com a obtenção de plantas de videira transformadas expressando genes de interesse, incluindo de resistência a fungos (Yamamoto *et al.* 2000, Agüero *et al.* 2006, Fan *et al.* 2008).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Determinação da sensibilidade ao antibiótico de selecção

Embriões somáticos de *V. vinifera* Trincadeira e Aragonéz no estado de torpedo a início de cotiledonar foram inoculados em caixas de Petri (9 cm →), contendo meio Nitsch e Nitsch (1969) suplementado com 2 % de sacarose, 100 mg/L de L-glutamina, 10 mg/L de L-fenilalanina e 1 mg/L de adenina. O meio foi solidificado com Sigma-Phytigel (0.2 %) e o pH foi ajustado a 5,75 antes de autoclavar (121 °C, 1 kg/cm² durante 15 min). As concentrações de canamicina avaliadas foram: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L. Foram inoculadas 2 caixas de Petri por cada concentração testada (35 embriões/caixa). Os embriões foram transferidos para frascos (15 embriões por frasco) quando atingiram uma dimensão que lhes permitiu serem inoculados na vertical. Os resultados relativos ao número de embriões convertidos foram analisados 90 dias após a inoculação em caixa de Petri.

2.2. Optimização das condições para transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1. Material vegetal

Foram utilizados *calli* embriogénicos de ambas as castas *V. vinifera* Trincadeira e Aragonez obtidos a partir da cultura de estames e ovários segundo procedimento previamente descrito (Cardoso 2006, Cardoso *et al.* 2009).

2.2.2. Condições de co-cultura e selecção de transformantes

As colónias de *A. tumefaciens* isoladas em meio LB sólido (Maniatis *et al.* 1982) contendo 50 mg/L de canamicina e 50 mg/L de rifampicina forma inoculadas em meio LB líquido (Maniatis *et al.* 1982) com igual suplemento de antibióticos e incubadas durante a noite a 28 °C e 200 rpm. Quando atingida uma OD (660 nm) de 0,8-1,0 a suspensão foi diluída 10x. Os *calli* embriogénicos foram mantidos em meio de igual composição salina ao meio descrito no ponto 2.1. contendo 2 µM de 2,4-D e 0,4 µM de BAP. Cerca de 500mg de *calli* foram colocados sobre papel de filtro e feridos com o bisturi previamente mergulhado na suspensão bacteriana sendo por fim completamente imersos nessa solução e inoculados durante 20 min. à temperatura ambiente. Após este período, o excesso de solução foi retirado e os *calli* foram transferidos para meio fresco de igual composição contendo 1 g/L de caseína hidrolisada e desprovido de reguladores de crescimento. Estas culturas foram mantidas durante 2 dias a 25 °C no escuro. Como controlo foram utilizadas duas caixas de *calli* não inoculados. Decorrido o período de co-cultura, os *calli* embriogénicos foram lavados 3x com meio líquido de igual composição ao meio de co-cultura suplementado com 300 mg/L de carbenicilina e 200 mg/L de cefotaxima. Em seguida foram colocados sobre papel de filtro, filtrados com uma bomba de vácuo e inoculados em meio sólido de igual composição. Os antibióticos carbenicilina e cefotaxima foram adicionados aos meios de cultura (sólido e líquido) após autoclavagem do meio a 121 °C, 1 kg/cm² durante 15 min. Os *calli*, putativamente transformados, foram repicados semanalmente para meio fresco de igual composição. Os embriões que se formaram, ao atingirem o estágio de torpedo, foram lavados com meio líquido de igual composição ao meio descrito no ponto 2.1 contendo 300 mg/L de carbenicilina, 200 mg/L de cefotaxima e 40 mg/L de canamicina. Em seguida, foram ino-

culados em meio sólido com igual composição e a mesma concentração de canamicina. Ulteriormente, os embriões que apresentaram os cotilédones clorofilinos e o hipocótilo alongado foram transferidos para tubo com 9 ml de meio sólido de igual composição mas desprovido de antibióticos e reguladores de crescimento.

2.2.3. Condições para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Nesta primeira abordagem avaliou-se a virulência de quatro estirpes de *A. tumefaciens*: C58C1, LBA4404, LBA2915 e EHA105. O sistema utilizado foi o sistema binário, sendo as bactérias portadoras do vector p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.* 1990).

2.2.4. A adição de acetosiringona

Uma colônia bacteriana da estirpe LBA4404 isolada em meio LB sólido com 50 mg/L de canamicina e 50 mg/L de rifampicina foi inoculada em meio LB líquido com igual suplemento de antibióticos e 100 µM de acetosiringona. Em paralelo, uma colônia da mesma estirpe de *A. tumefaciens* foi inoculada em meio com igual composição, mas sem a adição de acetosiringona. O procedimento seguido foi idêntico ao descrito no ponto 2.2.2.

2.2.5. Análise de transformantes

A expressão transiente foi avaliada por estudo histoquímico, 2 dias após co-cultura. Porções de *calli* de cada ensaio foram inoculadas numa solução de X-gluc (400 µg/ml) e incubadas a 37 °C durante a noite.

A integração dos transgenes *gus* e *nptII* foi avaliada por PCR utilizando como *template* o DNA genômico de plantas obtido segundo o protocolo descrito por Edwards *et al.* (1991). Os *primers* para amplificação do gene *gus* foram desenhados para amplificar um fragmento de 998 pb (5'-GCAGCCCGGCTAACGTATCCAC-3'; 5'-CACC-TGGGTGGACGATATCACC-3') e do gene *nptII* de 500 pb (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTGG-3'; 5'-ATCGGCTCCGTCGATACTAT-3'). As condições de PCR para amplificação do primeiro foram 5 min a 94 °C, seguindo 30 ciclos com 30 s a 94 °C e 2 min a 68 °C, e do segundo 94 °C durante 3 min, seguindo-se

30 ciclos com 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 1 min a 68 °C. A existência de falsos positivos (plantas contaminadas com *A. tumefaciens*) foi determinada por PCR utilizando *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene *virC* com 730 pb segundo protocolo descrito por Mozsár *et al.* (1998). O produto das diferentes amplificações foi analisado por electroforese num gel de agarose 1,2 % com 0,25 µg/ml de EtBr.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da sensibilidade ao antibiótico de selecção

A adição de canamicina ao meio de conversão permitiu verificar na casta Aragonez uma diminuição da taxa de conversão de 40 % (controlo) para 30 % em meio com 10 mg/L de canamicina, e para 7 % em meio com 30 mg/L (Fig. 1). Na casta Trincadeira observou-se um padrão semelhante. A suplementação do meio com 10 mg/L deste antibiótico provocou uma diminuição da taxa de conversão de 43 % (controlo) para 23 %, diminuindo para 9 % em meio com 30 mg/L. Em ambas as castas, o aumento da concentração de canamicina esteve relacionada com a inibição da conversão e o aumento do número de embriões necrosados. Na casta Aragonez foi atingida uma taxa de 100 % de embriões necrosados com uma concentração de 40 mg/L, enquanto na casta Trincadeira foi necessária uma concentração de 60 mg/L (Fig. 1).

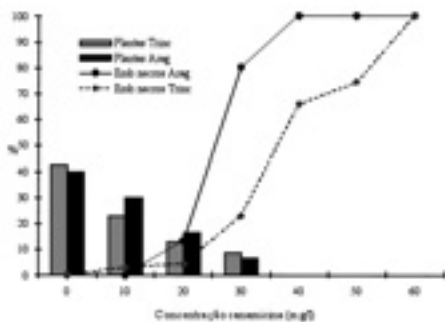


Fig. 1. Efeito do antibiótico canamicina na conversão de embriões somáticos de *F. viciifera*, castas Trincadeira e Aragonez, 90 dias após inoculação. As colunas correspondem às plantas regeneradas e as linhas aos embriões necrosados.

Foi possível obter plantas fisiologicamente saudáveis, de ambas as castas, provenientes de embriões inoculados em meio controlo (Fig. 2-A), e em meio com a menor concentração testada deste antibiótico (10 mg/L) (Fig. 2-B). No entanto, os sintomas de toxicidade foram visíveis desde a concentração mais baixa. Plantas com apenas 2 a 4 nós, de entre-nós muito curtos, sem raízes, com caules e folhas amareladas e/ou avermelhadas foram comuns em meio de conversão com 10, 20 e 30 mg/L (Fig. 2-B, 2-C e 2-D). A adição de uma concentração superior, entre 40 e 60 mg/L, esteve associada ao desenvolvimento anómalo dos embriões, inibição total da rizogénese e do desenvolvimento do sistema apical, sendo comum a todos, uma coloração branca-amarelada (Fig. 2-E e 2-F). De acordo com os resultados obtidos, seleccionou-se para ambas as castas a concentração de 40 mg/L para exercer a pressão selectiva. Esta encontra-se um pouco abaixo das concentrações de canamicina referidas em trabalhos de transformação genética (Perl *et al.* 1996), o que poderá indicar uma maior sensibilidade das duas castas estudadas neste trabalho.

3.2. Optimização das condições para transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A reacção histoquímica com X-gluc permitiu observar expressão transiente do gene *gus* em *calli* transformados com duas das estirpes de *A. tumefaciens* testadas, a LBA4404 e a LBA2915. Ainda que as castas de *V. vinifera* sejam susceptíveis a todas as estirpes de *A. tumefaciens*, Torregrosa *et al.* (2002) referem a existência de diferenças na eficiência de transformação entre diferentes estirpes de *A. tumefaciens*.

Segundo diversos autores, as estirpes EHA são mais eficientes na transformação de algumas castas *V. vinifera*, sendo comumente utilizadas as estirpes EHA101 e a EHA105 (Iocco *et al.* 2001; Wang *et al.* 2005; Dhekney *et al.* 2009). Contudo, existem várias referências à utilização da estirpe LBA4404 na transformação genética de videira (Mullins *et al.* 1990, Harst *et al.* 2000, Gutoranov *et al.* 2001). Nas duas castas em estudo, os primeiros embriões foram observados 2 semanas após co-cultura. A obtenção de plantas putativamente transformadas e a sua selecção com canamicina foi confirmada pela conversão de embriões sob condições de selecção em meio de cultura com 40 mg/L de canamicina.

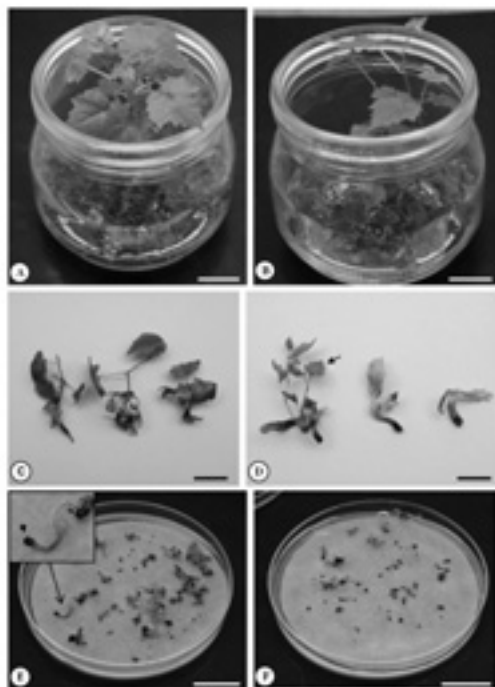


Fig. 2. Efeito da canamicina na conversão de embriões somáticos de *V. vinifera* casta 'Aragonez' após 90 dias em meio de conversão. **A:** plantas resultantes da conversão de embriões inoculados em meio sem antibiótico (controle); **B:** plantas resultantes da conversão de embriões somáticos inoculados em meio com 10 mg/L de canamicina; **C:** plântulas resultantes da conversão de embriões inoculados em meio sem 30 mg/L de canamicina; **D:**

O sistema de transformação permitiu produzir um elevado número de embriões putativamente transformados. Porém, independentemente da optimização do protocolo de conversão de embriões somáticos, a capacidade de conversão foi reduzida. Do elevado número de embriões obtidos a partir dos *calli* co-cultivados com as duas estirpes, só os *calli* co-cultivados com a estirpe LBA4404 converteram em plantas, sendo obtida uma planta da casta Aragonez (Fig. 3-A) que, por PCR, se confirmou estar transformada com ambos os transgenes (*reporter gus* e de selecção *nptII*) (Fig. 3-B). Essa amplificação não correspondeu a um falso positivo já que não ocorreu amplificação do fragmento correspondente ao gene *virC*. O facto de se ter obtido apenas uma planta não parece, no entanto, ser suficiente para atribuir este facto à diferença entre estirpes.

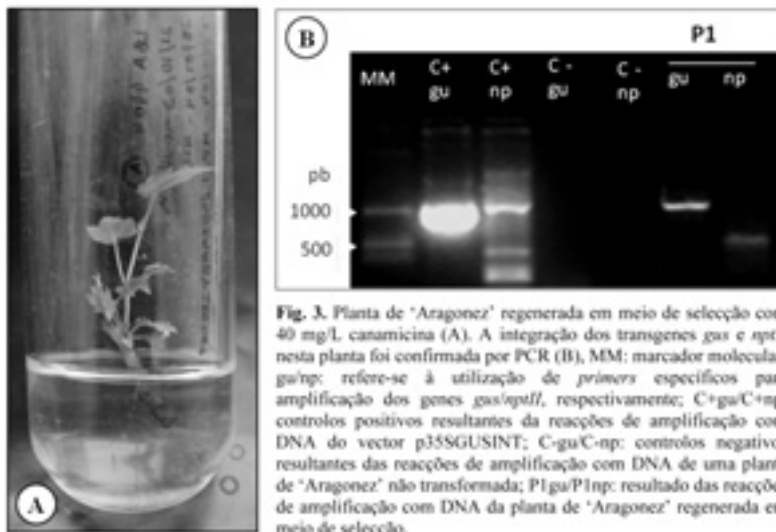


Fig. 3. Planta de 'Aragonez' regenerada em meio de selecção com 40 mg/L canamicina (A). A integração dos transgenes *gus* e *iptII* nesta planta foi confirmada por PCR (B), MM: marcador molecular; gu/np: refere-se à utilização de *primers* específicos para amplificação dos genes *gus*/*iptII*, respectivamente; C+gu/C+np: controlos positivos resultantes das reacções de amplificação com DNA do vector p35SGUSINT; C-gu/C-np: controlos negativos resultantes das reacções de amplificação com DNA de uma planta de 'Aragonez' não transformada; P1 gu/P1np: resultado das reacções de amplificação com DNA da planta de 'Aragonez' regenerada em meio de selecção.

A adição de 100 μ M de acetosiringona ao meio de crescimento da bactéria e ao meio de co-cultura potenciou, de maneira notória, a expressão transiente do gene *gus* em *calli* embriogénicos de ambas as castas. Diferentes autores referem a utilização de acetosiringona como substância potenciadora da eficiência do processo de transformação genética de videira (Harst *et al.* 2000, Iocco *et al.* 2001, Torregrosa *et al.* 2002, Wang *et al.* 2005). De acordo com estes resultados torna-se imprescindível a utilização de acetosiringona aquando da realização de trabalhos de transformação com genes de interesse.

4. CONCLUSÕES

O resultado deste estudo demonstrou o sucesso na transformação de ambas as castas ao ser visível a expressão do gene *gus* aquando da utilização de duas estirpes de *A. tumefaciens*. A conversão em planta integrando ambos os transgenes (gene *reporter* e gene de selecção) foi pela primeira vez descrita numa casta Portuguesa de elevado interesse vitivinícola, o que permite considerar o protocolo para ulterior inserção de genes de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÜERO *et al.* (2006) Genetic transformation of *Vitis vinifera* L. cvs Thompson Seedless and Chardonnay with the pear PGIP and GFP encoding genes. *Vitis* 45:1-8.
- CARDOSO *et al.* (2009) *In vitro* Somatic Embryogenesis from Stamens of Trincadeira, a Portuguese *Vitis vinifera* L. cultivar. *Acta Hort* 812: 305-311.
- CARDOSO (2006) Transformação genética de *Vitis vinifera* L. castas Trincadeira e Aragonez para a introdução de resistência ao fungo *Uncinula necator* (Sch.) Burrill. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa.
- DHEKNEY *et al.* (2009) Factors influencing genetic transformation and plant regeneration of *Vitis*. *Am J Enol Vitic* 60:285-292.
- EDWARDS *et al.* (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19:1349.
- FAN *et al.* (2008) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:197-206.
- GUTORANOV *et al.* (2001) Genetically engineered grapevine carrying GFLV coat protein and antifreeze genes. *Agriculture Conspectus Scientificus* 66:71-76.
- HARST *et al.* (2000) Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium* –mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants. *Vitis* 39:99-102.
- HEMSTAD & REISCH (1985) *In vitro* production of galls induced by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* on *Vitis* and *Rubus*. *Plant Physiol* 120:9-17.
- IOCCO *et al.* (2001) Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L.. *Transgenic Res* 10:105-112.
- KIKKERT *et al.* (1996) Transgenic plantlets of ‘Chancellor’ grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep* 15:311-316.
- KIKKERT *et al.* (2001) Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. *Acta Hort* 447: 273-279.
- MANIATIS *et al.* (1982) *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MOZSÁR *et al.* (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis* 37:127-130.

- MULLINS *et al.* (1990) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L.. Bio-Technology 8:1041-1045
- NITSCH & NITSCH (1969) Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87.
- PERL *et al.* (1996) Establishment of an *Agrobacterium* mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. Nat Biotechnol 14:624-628.
- TORREGROSA *et al.* (2002) Influence of *Agrobacterium* Strain, Culture Medium, and Cultivar on the Transformation Efficiency of *Vitis vinifera* L.. Am J Enol Vitic 53:183-190.
- VANCANNEYT *et al.* (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Mol Gen Genet 220:245-250.
- WANG *et al.* (2005) Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. Plant Science 168:565-571.
- YAMAMOTO *et al.* (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. Plant Cell Rep 19:639-646.

FAMÍLIAS DE AROMAS DE MOSTOS PROVENIENTES DE UVAS SECAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ

María J. RUIZ¹; Margarita CHAVES¹; Luis ZEA¹; Lourdes MOYANO¹; Manuel MEDINA¹

RESUMO

Através de uma análise CG-EM, foi estudada a fracção aromática de mostos provenientes de uvas secas ao sol durante 0, 2, 4, 6, 8 dias, assim como as secas durante 5 dias numa câmara em condições controladas. Os valores de actividade aromática (VAOs) dos compostos analisados foram agrupados em 8 famílias de aromas (frutada, química, balsâmica, substâncias gordas, vegetal, empireumática, floral e especiada) de acordo com os seus descritores aromáticos similares. Estas séries foram submetidas a uma análise dos compostos principais (ACP) cujos dois primeiros compostos explicam 93,8% da variabilidade total. O CP1 (60,4%), essencialmente influenciado pelas séries frutada e balsâmica, não se distinguiu claramente entre os mostos finais obtidos por ambos os métodos de secagem. No entanto, o CP2 basicamente influenciado pelas séries vegetal e floral, diferenciou claramente os dois tipos de mosto. Estes resultados sugerem que a secagem da uva em condições controladas poderia melhorar o perfil aromático dos mostos destinados à elaboração de vinhos doces tipo sherry Pedro Ximénez.

Nota do tradutor: CG-EM Cromatografia gasosa – espectrometria de massa

VAOs - Valores de Actividade Odorante

D.O. Montilla-Moriles – Denominação de Origem Montilla-Moriles

Palavras-chave: Passificação, Aroma, mosto, Pedro Ximénez, Famílias de aromas.

¹ Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba
Edificio Marie Crie. Campus de Rabanales. 14014 Córdoba (Spain)
Correspondencia a L Zea, email: qe1zeal@uco.es

1-INTRODUÇÃO

A procura, por parte do consumidor, de vinhos doces obtidos da variedade de uva Pedro Ximénez já transformada em uva passa da D.O. Montilla-Moriles (Sul de Espanha) aumentou consideravelmente nos últimos anos. A primeira etapa fundamental no processo tradicional de elaboração destes vinhos doces começa com a secagem das uvas por exposição ao sol, durante um período variável de entre 5 a 10 dias dependendo da meteorologia da região para o qual, optimamente, se requerem temperaturas diurnas elevadas e o menor valor possível de humidade ambiental.

A exposição ao sol provoca basicamente a desidratação e escurecimento das uvas que posteriormente vão originar um mosto de cor muito escura e muito açucarado (CHAVES *et al.*, 2007) com um potencial alcoólico que normalmente duplica em relação ao valor das uvas recém-colhidas. É muito importante que a secagem das uvas seja homogénea e moderada, já que a prensagem e, inclusive, o esmagamento são extremamente difíceis a partir de certos níveis de evaporação de água da polpa do bago. Para isso, as uvas são expostas ao sol estendidas sobre esteiras de plástico (antigamente *de ráfia*) em terrenos arenosos e com um certo declive convenientemente orientado. Durante a secagem, as uvas são viradas manualmente de forma periódica para se conseguir uma concentração homogénea dos seus componentes.

Um método alternativo à secagem ao sol consiste em submeter as uvas, e muitos outros produtos hortícolas (VEGA-MERCADO *et al.*, 2001), a uma evaporação superficial por convecção com ar quente em cabines ou câmaras de secagem. Este procedimento de secagem apresenta algumas vantagens quando comparado com o método de secagem ao sol tradicional, já que evita o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas, assim como a possível contaminação causada por insectos e pó. Pode encontrar-se uma descrição detalhada de algumas técnicas de secagem por ar quente nos trabalhos de KARATHANOS e BELESSIOTIS (1996), VAZQUEZ *et al.* (1997), PANGAVHANE *et al.* (2002), MARGARIS e GHIAUS (2007) e ESMAILI *et al.* (2007).

Tendo em conta o que se expôs anteriormente, deduz-se que a secagem da uva, que é a primeira etapa na elaboração do vinho doce Pedro Ximénez, requer um controlo rigoroso. Particularmente, no que se refere à fracção aromática, é conveniente estabelecer a actividade aromática dos mostos procedentes das uvas secas que posteriormente se

manifestará em grande medida nos vinhos. Neste trabalho, estuda-se o perfil aromático das uvas durante a secagem tradicional ao sol e, adicionalmente, é feita a comparação com o das uvas secas numa câmara em condições higrométricas controladas, com o objectivo de encontrar uma alternativa possível e vantajosa à secagem tradicional.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Mostos

Foi utilizada uva madura cv. *Pedro Ximénez* proveniente da Denominação de Origem Montilla-Moriles (Sul de Espanha). As amostras foram obtidas a partir das uvas expostas ao sol depositadas em 10 esteiras de secagem de 20 metros cada uma, denominadas de “passeiras”. A recolha da amostra foi feita às 8h30 am., retirando-se aleatoriamente 8 kg de uva ao final dos dias 0 (dia inicial), 2, 4, 6 e 8 dias (final da secagem). Durante a secagem, as temperaturas diurnas podem ultrapassar os 40°C, enquanto os valores nocturnos raramente descem abaixo dos 18°C. A humidade média do ambiente durante os 8 dias de secagem foi de 45%. No segundo ensaio, três lotes de uvas (8 kg cada um) foram estendidos uniformemente do mesmo modo que o tradicional (14 kg/m²) no interior de uma câmara de secagem, modelo Frisol Climatronic fabricada em Espanha, durante 5 dias a uma temperatura de 40°C e uma humidade relativa de 30%. A prensagem das uvas previamente esmagadas foi realizada, numa sala com termostato regulado a 20°C mediante o uso de uma prensa vertical similar às que se usam a nível industrial (modelo EG-250 Sanahuja, Castellón, Espanha). A maior pressão alcançada em cada ciclo de prensagem foi de 300 bar, e cada lote de uvas foi prensado em três ciclos. Os mostos obtidos foram centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm.

Os mostos procedentes de uvas secas ao sol de forma tradicional durante 8 dias (final da passificação) e os mostos procedentes de uvas secas em câmara com ambiente controlado apresentaram respectivamente 49.8 e 48.0°Brix.

2.2. Análise experimental

Os °Brix foram medidos utilizando um refractómetro modelo Master-Baume (ATAGO CO., LTD, Tokio, Japão). Cada composto de aroma foi identificado pelo seu tempo de retenção e confirmado mediante espectrometria de massas (Hewlett-Packard

5972 MSD, CA, EUA). As condições do espectrómetro de massa foram: modo scan (EM 1.612 V) com uma amplitude de massa atómica entre 39 e 300. As condições cromatográficas foram as mesmas que se empregaram na quantificação dos compostos do aroma que se descreve em seguida.

Começou-se com 100 mL de mosto nos quais se ajustou o valor de pH para 3,5 e se adicionou 150 µg de 2-octanol como padrão interno. Posteriormente levou-se a cabo uma extracção com freón-11 de forma contínua durante 24 horas, seguida de uma concentração dos extractos obtidos até 0,2 mL num micro concentrador tipo Kuderna-Danish. De seguida foram injectados 3 µL num cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890 series II) equipado com uma coluna capilar (HP-INNOWax de 60 m x 0,32 mm), um injector em modo *split/splitless* e um detector FID. O programa de temperaturas do forno foi: 5 min a 45°C, 1°C/min até 185 °C e 30 min a 185°C. O injector e o detector mantiveram-se a 275 °C e 300 °C respectivamente. O gás portador foi o Hélio a 70 kPa numa relação de 1:30. A quantificação foi realizada mediante factores de resposta absolutos, calculados para cada composto em relação ao padrão interno a partir de dissoluções de concentração conhecida de compostos comerciais de pureza >95% fornecidos pela Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha). A determinação cromatográfica foi efectuada em triplicado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar na Tabela 1, a família aromática que agrupa um maior número de compostos é a série dos compostos frutados com 13 compostos, seguida da família de substâncias gordas (9), enquanto a de especiarias, com 2, é a família que engloba um menor número de compostos. As restantes famílias (química, balsâmica, vegetal, empireumática e floral) incluem 4 compostos cada uma.

Tabela 1. Carácteres aromáticos dos compostos analisados nos mostos. Em negrito é assinalado o composto que mais contribui em cada família.

| Composto | Descritores de aroma | Famílias aromáticas |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Acetato de etilo | Ananás, verniz, anis | Frutada, química, balsâmica |
| 1,1-Dietoxietano | Fruta verde, alcaçuz | Frutada, balsâmica |
| 2,3-Butanodiona | Manteiga | Substâncias gordas |
| 2-Butanol | Avinhado | Química |
| 2,3-Pentanodiona | Manteiga | Substâncias gordas |
| Hexanal | Verde | Vegetal |
| Isobutanol | Álcool, avinhado, verniz | Química |
| Acetato de isoamilo | Banana | Frutada |
| 1-Butanol | Medicinal | Balsâmica |
| Álcoois isoamílicos | Álcool, verniz | Química |
| Acetato de hexilo | Maçã, pêra, banana | Frutada |
| Acetona | Manteiga, nata | Substâncias gordas |
| Lactato de etilo | Morango, framboesa, manteiga | Frutada, substâncias gordas |
| 1-Hexanol | Erva cortada, resinoso, nata fresca | Vegetal, substâncias gordas |
| <i>E</i> -2-Hexenol | Erva verde | Vegetal |
| Furfural | Amêndoa tostada, incenso, floral | Empíreumática, floral |
| Benzaldeído | Amêndoa amarga, noz, fumado | Frutada, empíreumática |

Tabela 1. (continuação) Características aromáticas dos compostos analisados nos mostos. Em negrito assinalam-se os compostos com maior contribuição em cada família.

| Composto | Descritores aromáticos | Famílias aromáticas |
|--|--------------------------------------|--|
| 5-Metilfurfural | Amêndoa amarga, especiarias | Frutada, especiarias |
| Ácido isobutanoico | Manteiga rançosa | Substâncias gordas |
| γ-Butirolactona | Coco, caramelo | Frutada, empireumática |
| Ácido 3-metilbutanoico | Queijo parmesão, ranço | Substâncias gordas |
| Ácido butanoico | Ranço, queijo | Substâncias gordas |
| Geraniol | Cítrico, doce | Frutada |
| γ -Heptalactona | Coco, herbáceo, caramelo | Frutada, vegetal, empireumática |
| Acetato 2-feniletanol | Rosa, mel | Floral |
| Álcool benzílico | Frutado, noz | Frutada |
| 2-Feniletanol | Rosa, mel | Floral |
| Ácido hexanoico | Queijo | Substâncias gordas |
| γ -Decalactona | Pêssego | Frutada |
| Farnesol | Frutado, balsâmico, floral, cravinho | Frutada, balsâmica, floral, especiarias |

^a Tirado de RUIZ et al. (2010).

Composto Descritores aromáticos Famílias aromáticas 5-Metilfurfural Amêndoa amarga, especiarias Frutada, especiarias Ácido isobutanoico Manteiga rançosa Substâncias gordas **γ -Butirolactona** Coco, caramelo Frutada, **empireumática** Ácido 3-metilbutanoico Queijo parmesão, ranço Substâncias gordas Ácido butanoico Ranço, queijo Substâncias gordas Geraniol Cítrico, doce Frutada γ -Heptalactona Coco, herbáceo, caramelo Frutada, vegetal, empireumática Acetato 2-feniletanol Rosa, mel Floral Álcool benzílico Frutado, noz Frutada **2-Feniletanol** Rosa, mel **Floral** Ácido hexanoico Queijo Substâncias gordas γ -Decalactona Pêssego Frutada **Farnesol** Frutado, balsâmico, floral, cravinho Frutada, balsâmica, floral, **especiarias** ^a Tirado de RUIZ et al. (2010).

A figura 1 mostra os valores de actividade aromática (VAO), calculados dividindo a concentração de cada composto pelo seu limiar de percepção das famílias de aromas nas quais estas se agrupam (perfil aromático) para os mostos obtidos a partir de uvas secas de forma tradicional por secagem ao sol e em câmara em ambiente controlado. Para os primeiros, a família das substâncias gordas é a maioritária em todos eles, devido essencialmente à contribuição da acetóina, que acusa um aumento com o tempo de secagem alcançando valores superiores a 150. As famílias frutada, vegetal e balsâmica exibem um comportamento similar mas com VAO muito mais baixos, enquanto a floral tende a manter-se com valores próximos de 12 durante todo o processo.

Da mesma forma, a família das especiarias também se encontra em todos os mostos mas com VAO apenas ligeiramente superiores à unidade. Como este último, as famílias empíreumática, presente nos mostos a partir do 2º dia, e química (a partir do 6º dia) também contribuem escassamente para o perfil aromático dos mostos (VAO \approx 1). Nos mostos procedentes de uvas secas em câmara sob condições controladas a família floral atinge os valores mais elevados (\approx 160) devido, principalmente, à actividade aromática do 2-feniletanol, enquanto não aparecem os aromas incluídos na família vegetal. Os VAO das restantes famílias não mostram grandes diferenças a respeito dos encontrados nos mostos obtidos no último dia de secagem ao sol.

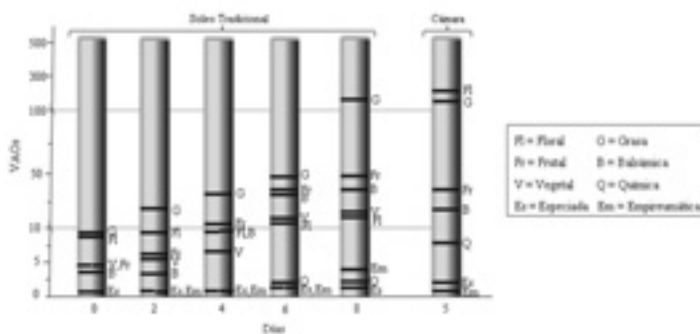


Figura 1. Perfil aromático dos mostos.

Por outro lado, os VAO das 8 famílias aromáticas de todos os mostos foram submetidos a uma análise dos compostos principais (ACP), resultando 2 compostos que acumulam 93,8% da variabilidade encontrada (Figura 2). O CP1 que explica o valor de 60,4% da mesma, que é influenciado principalmente pelas famílias frutada e de substâncias gordas, não separa claramente os últimos mostos procedentes da secagem tradicional (PT, 8 dias) dos mostos obtidos a partir de uva seca em câmara (PC, 5 dias). Não obstante, o segundo composto principal, essencialmente influenciado pelas séries vegetal e floral, distinguem-se em ambos os mostos.

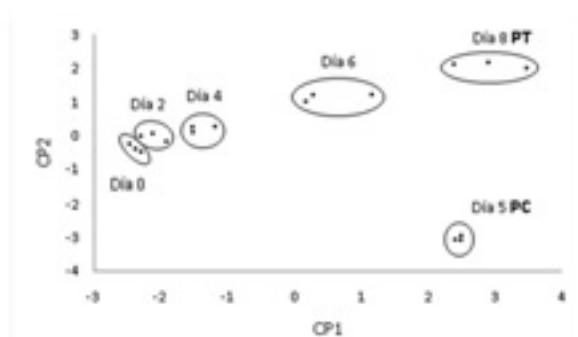


Figura 2. Pontuações das amostras sobre os 2 compostos principais.

Em geral, as notas florais são positivas para o aroma dos vinhos, particularmente dos provenientes de uvas passas (FRANCO *et al.*, 2004; MÁRQUEZ *et al.*, 2008), enquanto as vegetais não costumam aportar aromas considerados agradáveis. Assim, os resultados obtidos poderiam constituir uma melhoria da secagem da uva destinada à elaboração dos reconhecidos vinhos doces Pedro Ximénez na D. O. Montilla-Moriles.

4. CONCLUSÕES

O aroma dos mostos obtidos de uvas secas tradicionalmente ao sol intensifica-se consideravelmente durante o período de secagem sendo as famílias de substâncias gordas, frutada e balsâmica as maioritárias no final do mesmo. Por outro lado, segundo

estes resultados, a secagem das uvas em câmara sob condições controladas poderia trazer vantagens, do ponto de vista aromático, em comparação com a tradicional secagem ao sol.

BIBLIOGRAFIA

- CHAVES M, ZEA L, MOYANO L, MEDINA M (2007) Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of Pedro Ximenez sweet wines. *J Agric Food Chem* 55:3592-3598.
- ESMAILI M, SOTUDEH-GHAREBAGH R, CRONIN K, MOUSAVI M, REZAZADEH G (2007) Grape drying: A review. *Food Rev Int* 23:257-280.
- FRANCO M, PEINADO R, MEDINA M, MORENO J (2004) Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximenez grape variety. *J Agric. Food Chem* 52:3905-3910.
- KARATHANOS V, BELESSIOTIS V (1996) Sun and artificial air drying kinetics of some agricultural products. *J Food Eng* 31:35-46.
- MARGARIS D, GHIAUS AD (2007) Experimental study of hot air dehydration of Sultana grapes. *J Food Eng* 79:1115-1121.
- MARQUEZ R, CASTRO R, NATERA R, GARCÍA-BARROSO, C (2008) Characterization of the volatile fraction of Andalusian sweet wines. *Eur Food Res Technol* 226:1479-1484.
- PANGAVHANE D, SAWHNEY R, SARSAVADIA P (2002) Design, development and performance testing of a new natural convection solar dryer. *Energy* 27:579-590.
- RUIZ MJ, ZEA L, MOYANO L, MEDINA, M (2010) Aroma active compounds during the drying of grapes cv. *Pedro Ximenez* destined to the production of sweet Sherry wine. *Eur Food Res Technol* 230:429-435.
- VAZQUEZ G, CHENLO F, MOREIRA R, CRUZ E (1997) Grape drying in a pilot plant with a heat pump. *Drying Technol* 15:899-920.
- VEGA-MERCADO H, GONGORA-NIETO M, BARBOSA-CANOVAS G (2001) Advances in dehydration of food. *J Food Eng* 49:271-289.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com apoio ao financiamento do MCYT (AGL 2006 04285) do Governo Espanhol.



UTILIZAÇÃO DE “STARTERS” DE FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA PARA CONTROLAR AS ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Vincent Renouf^(1,2), Marie-Laure Murat⁽²⁾, Virginie Moine⁽¹⁾

RESUMO

A Fermentação maloláctica (FML) é uma fase importante da vinificação, resultando na desacidificação, na evolução do aroma e na estabilização microbiológica. Contudo, apesar da sua importância, a FML nem sempre é uma fermentação perfeitamente controlada. Entre as bactérias do ácido láctico (LAB) das espécies inicialmente presentes, a principal responsável pela FML é a *Oenococcus oeni* (*O. oeni*), porque é uma das bactérias mais resistentes ao etanol. Dependendo das características do vinho e da capacidade das estirpes *O. Oeni* indígenas, a implementação da FML é mais ou menos eficiente. Em alguns casos, quando o nível de etanol é muito elevado, pode ocorrer um longo período de latência entre o final de FA e o início da FML. A fase crítica pode ser favorável para o crescimento de espécies prejudiciais como a *Brettanomyces bruxellensis* e produtores LAB de amins biogénicas. O objectivo deste estudo foi destacar as interações entre a performance da *O. Oeni* na FML e os microrganismos de deterioração: *B. bruxellensis* e as bactérias produtoras de amins biogénicas. Na FML, envolvendo micro - organismos indígenas quanto mais difícil for para as *O. Oeni* desenvolverem-se e fermentarem, maior é a aparente colonização do vinho pela *B. bruxellensi*. Além disso, em vinhos nos quais é difícil executar a FML (elevada concentração de etanol...), algumas bactérias indígenas podem aproveitar para estragar o vinho produzindo amins biogénicas. A gestão cuidadosa da FML é, portanto, indispensável para prevenir qualquer risco de alterações no vinho. A utilização de *starters* conduz a elevadas e activas populações seleccionadas de *O. Oeni* e previne o crescimento de espécies prejudiciais. Finalmente, a utilização preventiva de um *starter* de maloláctica é a melhor ferramenta para minimizar o desenvolvimento da *B. Bruxellensis*, produção de amins biogénicas e consequentemente o risco de alterações no vinho.

PALAVRAS CHAVE: starters de maloláctica, alterações microbiológicas, amins biogénicas.

¹ LAFFORT BP 17 33072 Bordeaux cedex France

² Laboratoire SARCO – filiale de recherche du groupe LAFFORT– BP 40, 33072 Bordeaux France
vincent.renouf@laffort.com

INTRODUÇÃO

O mosto transforma-se em vinho como resultado da actividade de diversos microrganismos. As primeiras a intervir são as leveduras, particularmente a *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (FA). Após a primeira fase, nos vinhos tintos e em alguns vinhos brancos ácidos e rosés, as bactérias lácticas (LAB), nomeadamente as espécies *Oenococcus oeni* transformam o ácido málico em ácido láctico e libertam CO₂. Trata-se da fermentação maloláctica (FML). Contudo, as bactérias presentes na vinificação nem sempre têm efeitos positivos e alguns são definitivamente prejudiciais à qualidade do vinho. Entre os vários tipos de contaminação microbiológica, a produção de fenóis voláteis (4-etilfenóis e 4-etilgaiacol) pela levedura *Brettanomyces bruxellensis* é considerada uma das mais problemáticas. A bactéria *B. Bruxellensis* está presente nas uvas (Renouf and Lonvaud-Funel 2007) e adapta-se particularmente bem às condições normais do vinho e não têm necessidades nutricionais elevadas. Além disso, *B. Bruxellensis* tem uma maior tolerância ao etanol do que a *S. cerevisiae* permanecendo activa no final da fermentação alcoólica enquanto a *S. cerevisiae* começa a diminuir (Renouf et al. 2006). A FML logo após à FA é uma etapa importante para prevenir o desenvolvimento da *B. bruxellensis* (Renouf et al. 2005). Outra importante contaminação microbiológica do vinho é a produção de aminas biogénicas por algumas estirpes indígenas de LAB (Ancin-azpilicueta et al. 2008). Estes compostos nomeadamente a histamina e a tiramina provocam alguns efeitos tóxicos (náuseas, vómitos, dores de cabeça...) aos consumidores dependendo do grau de tolerância. Outras aminas biogénicas: putrescina e cadaverina conduzem à perda de frescura e carácter frutado. Tal como a *Brettanomyces*; as estirpes de bactérias que produzem aminas biogénicas tiram vantagem do período de latência entre a FA e a FML.

FML, uma fase que envolve interações entre *O. Oeni* e *B. bruxellensis*

Durante a FA, o mosto, com a sua elevada concentração de nutrientes, oferece condições favoráveis ao desenvolvimento microbiológico e é convertido em vinho, que tem défices nutricionais e elevada concentração de etanol. Isto conduz à selecção das espécies mais resistentes. Entre as bactérias, uma das espécies mais resistentes é a *O. Oeni*, enquanto a *B. Bruxellensis* é a levedura mais resistente. No final da FA, a popu-

lação *S. cerevisiae* cai, deixando a *B. bruxellensis* e a *O. Oeni* a competirem pelo meio ecológico. Assim, entre o domínio da *S. Cerevisiae*, durante a FA e antes do pico da atividade da *O. Oeni* durante a FML, o ecossistema microbiológico do vinho está vazio.

Esta instabilidade é extremamente favorável para o crescimento da *B. Bruxellensis*. Por este motivo, nesta fase do processo de vinificação, as populações relativas de *O. oeni* e *B. bruxellensis* devem ser controladas de forma a prevenir a contaminação. O risco de desenvolvimento de *B. Bruxellensis* está dependente do tempo necessário para a população de *O. Oeni* atingir 10^6 CFU/mL para iniciar a FML. Quando a FML é longa e mais difícil, a *B. bruxellensis* tira vantagem da situação para se desenvolver no vinho. Isto leva a considerar o efeito dos *starters* da maloláctica desenvolvidos com o objectivo de facilitar o início e finalização do processo de FML.

Starters da fermentação maloláctica, uma ferramenta indispensável para reduzir o risco de contaminação por *Brettanomyces*

A investigação mostra na figura 1 a eficiência da inoculação de um *starter* da maloláctica: Lactoenos SB3® (LAFFORT) reduz o tempo necessário para completar a FML em aproximadamente 60% por comparação com as estirpes indígenas. Isto deve-se ao facto de adicionar 10^6 CFU/mL de uma população de *O. Oeni* que reduz o tempo necessário para os microrganismos indígenas atingirem este nível de população. Além disso, Lactoenos SB3® têm uma melhor capacidade de fermentação que as estirpes indígenas. Esta diferença de cinéticas tem um impacto real no desenvolvimento da *B. Bruxellensis*, pois a população no final da FML, após a inoculação era apenas de 10^2 CFU/mL, atingindo 6.10^3 CFU/mL, quando a FML depende exclusivamente dos microrganismos indígenas.

A quantidade de fenóis voláteis foi também mais de dois terços inferior no vinho inoculado. Estas diferenças persistiram até ao fim do período de monitorização, passados 50 dias. Apesar da sulfitação idêntica (SO_2 livre=30 mg/L), a população *B. Bruxellensis* manteve-se em $2.6.10^3$ CFU/mL no grupo indígena, considerando que não foram sequer medidas no lote inoculado (<1 CFU/mL). A população de *O. Oeni* também se manteve superior no grupo indígena, o que confirma outro argumento a favor dos starters de ma-

loláctica. As estirpes indígenas *O. oeni* que permanecem no vinho, após a sulfitação são susceptíveis de provocar deterioração, aumentando a acidez volátil (0.47 g/L no lote indígena e 0.27 g/L no lote inoculado) e produzindo contaminantes, tais como as aminas biogénicas.

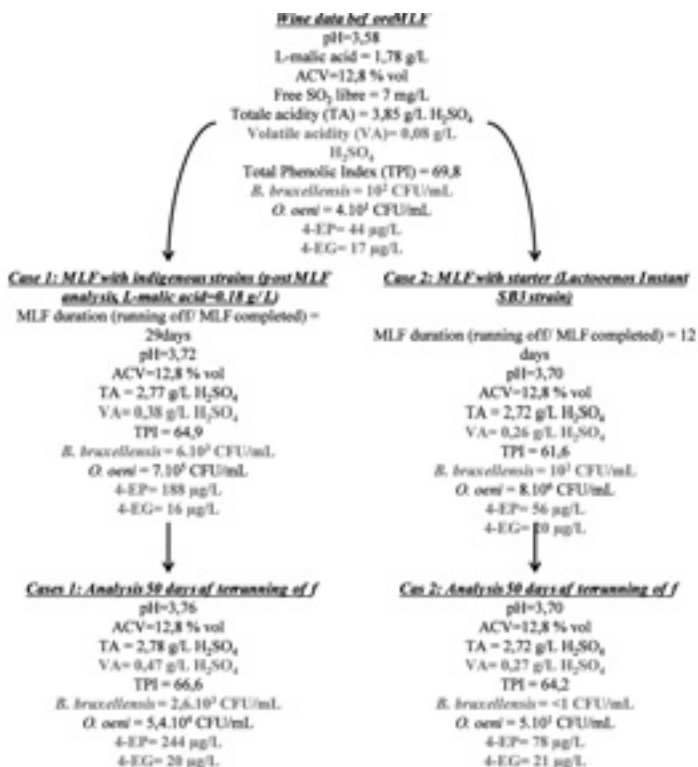


Figura 1: Efeito da inoculação com LAB seleccionados (Lactococcus Instant SB3) nas características do vinho após a FML

As estirpes de *O. Oeni* são essenciais para uma óptima prevenção dos riscos de *Brettanomyces*. A estirpe deve ter a maior taxa de sobrevivência possível na inoculação, com o objectivo de colonizar o ecossistema, em detrimento da *B. bruxellensis*. Deve possuir também excelentes cinéticas de fermentação: quanto mais rápido o ácido L- málico é consumido, mais rápido podemos sulfitar o vinho. Na prática, a análise de vários

depósitos a partir de um lote homogéneo inoculado com diferentes estirpes *O. Oeni* mostrou que quanto mais depressa a FML for concluída, menos tempo tinha a *B. Bruxellensis* para contaminar o vinho. A FML foi sempre mais lenta com os microrganismos indígenas, enquanto a produção de fenóis voláteis foi mais elevada. Por outro lado, a FML foi muito rápida (passados 12 dias desde a conversão total em ácido L-málico) e a produção de fenóis voláteis foi muito baixa quando o vinho foi inoculado com starters eficientes de maloláctica: Lactoenos 450 PreAc® e Lactoenos Instant SB3® estirpes (Laffort).

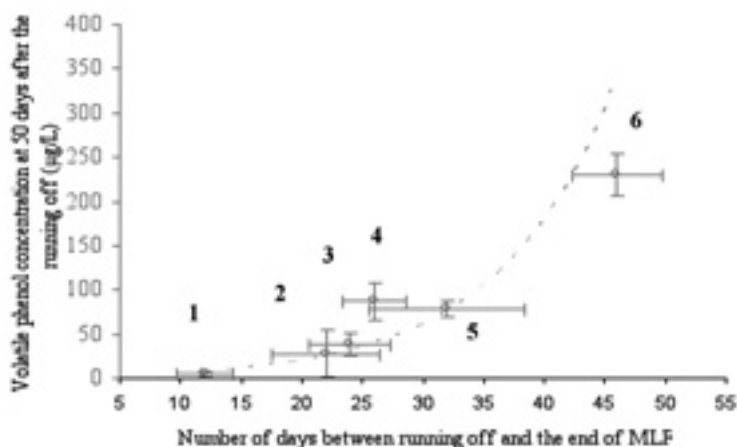


Figura 2: Efeito de diferentes estirpes *O. oeni* (1: Lactoenos Instant SB3®, 2: Lactoenos 450 PreAc®, 3: SB5, 4: SB7, 5: estirpes indígenas) na FML e a produção de fenóis voláteis (4-ethylfenol e 4-ethylgaiacol).

Relativamente à problemática das aminas biogénicas foram obtidos resultados semelhantes. Os ensaios apresentados na (Tabela 1) starters de maloláctica: Lactoenos SB3® (LAFFORT) e Lactoenos 450 PreAc® (LAFFORT) foram adicionados dois dias após o início da FA (co-inoculação) e no final da FA: no grau brix 0° (co-inoculação tardia). Isto corresponde a protocolos de co-inoculação de leveduras e bactérias desenvolvidas para melhorar a eficiência do starter de maloláctica, em termos de realização de FML e também para prevenir alterações no vinho (Murat et al. 2007, Renouf et al. 2008). Com estas técnicas, a soma das populações activas: as leveduras secas de FA e as bac-

térias malolácticas para FML, nunca descem abaixo dos 10^6 CFU/mL até que o vinho esteja protegido pela adição de SO_2 após a fermentação, “impedindo a entrada” das espécies indesejáveis como as bactérias produzidas pelas aminas biogénicas e *B. bruxellensis*.

Tabela 1: Compilação de dois estudos diferentes com Lactoenos SB3® adicionado em co-inoculação precoce & Lactoenos 450 PreAc® adicionado em co-inoculação tardia em comparação com a FML indígena.

| | | Lactoenos SB3® co-inoculação precoce | Lactoenos 450 PreAc® co-inoculação tardia | MLF indígenas |
|--|--|--|--|------------------|
| Ensaio 1 Cabernet-Sauvignon de Bordeaux 2008 | Dias após a vindima, após ter sido concluída a FML | 18 | 36 | 74 |
| | Concentração de histamina (mg/L), no vinho, 90 dias após a vindima | < 2 | < 2 | 12,2 |
| Ensaio 1 Grenach do vale do Rhône 2009 | Dias após a vindima, após ter sido concluída a FML | 14 | 40 | 66 |
| | Concentração de histamina (mg/L), no vinho, 90 dias após a vindima | 2,2 | 3 | 14 |

CONCLUSÕES

Este trabalho confirma a importância do início da FML em termos de alteração do vinho. Existe uma correlação significativa entre o desenvolvimento de bactérias de contaminação e o tempo necessário para o início da FML. Provavelmente é a consequência indirecta da competição entre a *O. Oeni* para a FML e as espécies contaminantes para preencher o ecossistema vazio deixado pela *S. Cerevisiae* desde o final da FA. Além disso, é obviamente preferível que a FML seja completada rapidamente, com o objectivo de sulfitar e proteger o vinho tão rapidamente quanto possível. O desenvolvimento recente de *starters* da maloláctica forneceu uma excelente ferramenta para controlar a FML. Além do seu impacto directo na melhoria da cinética de fermentação maloláctica, os *starters* monopolizam o ecossistema em detrimento da flora indígena. Assim, os *starters* minimizam a produção de acidez volátil, aminas biogénicas e aromas indesejados dos fenóis voláteis. Contudo, a utilização de *starters* de maloláctica deve ser controlada e planeada previamente no processo de vinificação. Não deve ser uma “solução de emergência”. Para obter melhores resultados é aconselhável utilizar *starters* de maloláctica numa acção de prevenção. O *starter* deve ser adicionado ao vinho durante a FA: logo

após o início do processo é a co-inoculação precoce de leveduras e bactérias; ou eventualmente no fim da FA, é a co-inoculação tardia de leveduras e bactérias. Desta forma, a soma das populações benéficas e activas: levedura seca activa para FA e depois *starter* de maloláctica para FML, nunca desce abaixo das 10^6 células activas por mililitro de vinho, protegida pela adição de SO_2 após a fermentação, “impedindo a entrada” das *Brettanomyces* e das estirpes de bactérias produtoras de aminas biogénicas.

BIBLIOGRAFIA

- Ancin-Azpilicueta, C., Gonzalez-Marco, A., Jimenez-Moreno, N., 2008. Current Knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 257-275.
- Gindreau, E., Joyeux, A., de Revel, G., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 1997. Evaluation de l'établissement des levains malolactiques au sein de la microflore bactériennes indigènes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31, 197-202.
- Murat, M.L., Gindreau, E., Augustin, C., Fuster, A., Malan, S., 2007. De la bonne gestion de la MLF, Partie I : les fondamentaux de la MLF. *Revue des œnologues*. Sous presse.
- Renouf, V., Gindreau, E., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005. Microbial changes during malolactic fermentation in red wine elaboration. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39, 1-12.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeasts species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1208-1219.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research*, 161, 154-167.



ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES FRACÇÕES FENÓLICAS DE VINHOS TINTOS DA REGIÃO DO DÃO

Helena CARVALHO¹; Sandra SANTOS¹; Fernando J. GONÇALVES^{1*};

RESUMO

Neste trabalho foi determinada a composição fenólica (taninos, antocianinas e compostos fenólicos totais) e a actividade antioxidante (métodos do DPPH e ABTS) de vinhos elaborados a partir de castas tintas da região do Dão. Os resultados obtidos mostraram uma correlação elevada entre estes dois parâmetros, em especial entre os compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante determinada pelo método do DPPH. Com o objectivo de avaliar a contribuição de diferentes fracções de compostos fenólicos para a actividade total dos vinhos, os compostos fenólicos presentes no vinho foram, fraccionados por cromatografia em fase sólida e determinada a actividade antioxidante de cada extracto obtido. Os resultados mostraram que os extractos ricos em compostos fenólicos poliméricos (antocianinas e proantocianidinas) eram aqueles que mais contribuíam para a actividade antioxidante total dos vinhos.

Palavras-chave: Actividade antioxidante, compostos fenólicos, vinhos tintos.

1 - INTRODUÇÃO

Os benefícios para a saúde humana do consumo moderado de vinho associado a uma alimentação equilibrada têm sido atribuídas aos seus compostos bioactivos, especialmente aos compostos fenólicos (VIRGILI e CONTESTABILE 2000; KATALINIÉ *et al.* 2004). Estes compostos apresentam potencial terapêutico (SABOLOVICA *et al.*, 2006) como sendo o efeito protector contra acidentes vasculares, doenças neurodegenerativas (VIRGILI e CONTESTABILE, 2000), circulatórias, inflamatórias (SOLEAS *et al.* 2002), assim como diminuem o risco de patologias de origem cancerígena (FRANKEL *et al.* 1993; TAPIERO *et al.* 2002).

¹ Falta nota

Os compostos fenólicos são de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados com a qualidade dos vinhos, pois contribuem para as propriedades sensoriais da cor, sabor, o corpo e adstringência dos vinhos. Uma das possíveis classificações dos polifenóis dos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides e em não flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte as flavanas, os flavonóis e as antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos benzóicos e os ácidos cinâmicos.

A Separação dos polifenóis do vinho em diferentes fracções é geralmente um primeiro passo para a sua posterior identificação e caracterização. No entanto, a diversidade estrutural e complexidade destes compostos torna difícil o seu fraccionamento. A cromatografia em coluna, por combinação sequencial de diferentes colunas e eluentes tem sido a técnica mais usada para a separação destes compostos.

A actividade antioxidante dos vinhos tem sido determinada por diferentes métodos *in vitro*. Os métodos mais comuns baseiam-se na capacidade de capturar um dado radical, tal como o ABTS (MILLER *et al.* 1993) e o DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995). Diferentes condições experimentais, tais como a geração do radical, o tempo de leitura, ou a expressão de resultados, tornam difícil a comparação dos resultados obtidos. No entanto, e apesar das diferenças inerentes a cada método, os resultados têm permitido obter conclusões similares (FERNÁNDEZ-PACHÓN *et al.* 2004).

Apesar dos estudos realizados sobre a composição fenólica e a actividade antioxidante de vinhos, existe ainda apenas um reduzido número de publicações sobre vinhos portugueses, nomeadamente da região demarcada do Dão. Assim, o objectivo do presente trabalho consistiu em determinar a composição fenólica e a actividade antioxidante de dez vinhos do Dão, disponíveis no mercado, bem como avaliar a contribuição de diferentes tipos de fracções de compostos fenólicos para a actividade antioxidante total dos vinhos.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados vinhos tintos da região demarcada do Dão, existentes no mercado nacional, elaborados a partir de uvas das castas, *Touriga Nacional*, *Tinta Roriz* e *Jaen*, no ano de 2007. O teor em compostos fenólicos totais foi determinado pelo reagent de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI 1965). O teor em antocianinas e em taninos totais foi determinado seguindo os procedimentos descritos pelo OIV

(2006). A actividade antioxidante foi determinada pelos métodos do DPPH e ABTS, seguindo as condições descritas por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e MILLER *et al.* (1993), respectivamente. O fraccionamento dos compostos fenólicos foi feito por adaptação do procedimento descrito por BAOSHAN *et al.* (2006). Todas as determinações foram efectuadas no presente trabalho, foram realizadas em triplicado.

3 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O quadro 1 mostra os valores de compostos fenólicos, antocianinas e taninos totais obtidos para os dez vinhos analisados. O teor em compostos fenólicos varia entre 1221 e 2630 mg/L o que está de acordo com o descrito na bibliografia por diversos autores (FRANKEL, *et al.* 1995; KATALINIC *et al.* 2004) para vinhos tintos. O vinho 5 é aquele que apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos bem como de taninos. O valor médio de taninos encontrado nestes vinhos foi de 1,4 g/L, num intervalo compreendido entre 0,9 e 2,6 g/L. Os valores de antocianinas quantificadas é semelhante ao descrito por GONÇALVES e JORDÃO (2009a; 2009b) para vinhos portugueses de castas tintas, variando entre 60,6 e 395,4 mg/L. De uma maneira geral pode-se afirmar que os vinhos V5, V6 e V3 eram aqueles que apresentavam maior riqueza em compostos fenólicos.

Quadro 1 – Composição fenólica geral dos diferentes vinhos estudados.

| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | V8 | V9 | V10 |
|----------------------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Compostos fenólicos ¹ | 1352 (±74) | 1855 (±93) | 2310 (±150) | 2198 (±99) | 2630 (±110) | 2520 (±250) | 1400 (±126) | 1538 (±168) | 1950 (±77) | 1221 (±61) |
| Antocianinas totais ² | 60,6 (±9,1) | 217,5 (±10,9) | 175,4 (±7,9) | 299,1 (±22,4) | 295,5 (±14,8) | 395,4 (±19,8) | 154,2 (±23,1) | 187,8 (±9,4) | 204,8 (±6,1) | 222,9 (±5,6) |
| Taninos Totais ³ | 1,0 (±0,0) | 1,5 (±0,1) | 2,1 (±0,3) | 1,0 (±0,1) | 2,6 (±0,2) | 1,9 (±0,1) | 0,9 (±0,0) | 1,3 (±0,1) | 1,2 (±0,0) | 0,9 (±0,1) |

⁽¹⁾ Expresso em mg/L equivalentes de ácido gálico; ⁽²⁾ Expresso em mg/L equivalentes de malvidina-3-glucósido;

⁽³⁾ Expresso em g/L;

Valores entre parêntesis representam o desvio padrão.

Na figura 1 estão representados os valores médios da actividade antioxidante total para os diferentes vinhos, obtidos pelos métodos do DPPH e do ABTS. Os valores de actividade antioxidante são expressos em milimolar de equivalentes de trolox (mM de TEAC) e foram obtidos a partir do gráfico da percentagem de inibição (ao fim de 30 e 15min de reacção para o DPPH e ABTS, respectivamente) em função da concentração de soluções padrão de trolox. Em qualquer um dos vinhos, o valor quantificado pelo método pelo método ABTS foi superior ao quantificado pelo método DPPH, o que está de acordo com GONÇALVES e JORDÃO (2009b).

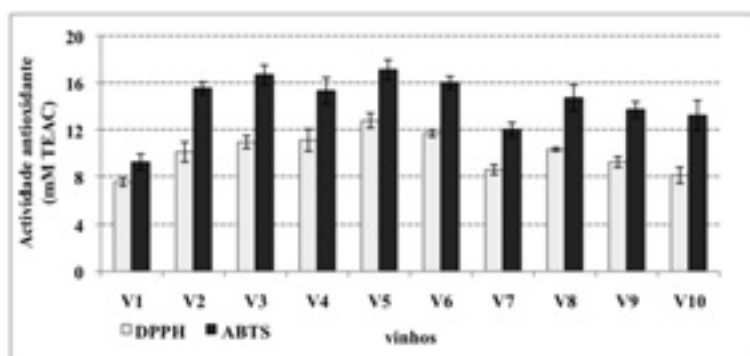


Figura 1 – Valores da actividade antioxidante total, pelo método do DPPH e do ABTS, para os vinhos analisados.

Os valores encontrados para a actividade antioxidante estão de acordo com a bibliografia (FERNÁNDEZ-PACHÓN *et al.* 2006) tendo sido o vinho V5 foi aquele que apresentou um valor mais elevado de actividade antioxidante, independentemente do método usado, 12,8 mM em equivalentes de trolox para o DPPH e 17,1 mM em equivalentes de trolox para o ABTS. Apesar da ordenação dos valores obtidos para os dois métodos não ter sido igual, de uma maneira geral pode-se dizer que se verificou uma boa correlação ($r^2 = 0,818$) entre os dois métodos.

O Quadro 2 mostra os valores de coeficientes de correlação entre a actividade antioxidante dos vinhos e a sua composição fenólica. A casta, as práticas enológicas de vinificação ou as condições de conservação são factores que influenciam a capacidade antioxidante dos vinhos (LACHMAN *et al.*, 2006; GONÇALVES e JORDÃO 2009a;

2009b), que está relacionada com a composição fenólica dos vinhos (FERNÁNDEZ-PACHÓN *et al.*, 2006; VILLANO *et al.*, 2005).

Quadro 2 – Coeficientes de correlação total entre a actividade antioxidante dos vinhos e a composição fenólica.

| Parâmetros | Coeficientes de correlação (R^2) | |
|----------------------------|--------------------------------------|-------|
| | DPPH | ABTS |
| Compostos fenólicos totais | 0,839 | 0,648 |
| Antocianinas totais | 0,629 | 0,525 |
| Taninos totais | 0,670 | 0,566 |

Pela análise do Quadro 2, é possível verificar que para qualquer um dos parâmetros analisados, a correlação entre estes dois parâmetros era mais forte quando a actividade antioxidante para o método do DPPH. A actividade antioxidante dos vinhos estava mais fortemente associada ao teor de compostos fenólicos totais, do que ao teor em antocianinas ou taninos, em especial no caso do método do DPPH. Os dados disponíveis na bibliografia são contraditórios, sendo que alguns autores referem que a actividade antioxidante está mais associada ao teor em compostos fenólicos totais (ARNOUS *et al.* 2002; SABOLOVICA *et al.*, 2006; ORAK *et al.* 2007), outros referem fortes correlações com os teores em antocianinas totais (KALT *et al.* 1999).

No sentido de avaliar a contribuição dos diferentes grupos de compostos fenólicos para a actividade antioxidante total dos vinhos, cinco dos vinhos analisados foram fraccionados por cromatografia de fase sólida em mini-coluna C-18, dando origem a quatro fracções distintas de compostos fenólicos. De acordo com BAOSHAN *et al.* (2006) a fracção F1 era sobretudo rica em ácidos fenólicos, a F2 em flavanóis monoméricos, a F3 em oligómeros de procianidinas e a fracção F4 compostos fenólicos poliméricos, nomeadamente antocianinas e proantocianidinas. Os compostos fenólicos são considerados como sequestradores de electrões e o seu poder antioxidante depende da sua estrutura química, em especial da sua capacidade em ceder hidrogénio ou electrões ou ainda deslocar um electrão da estrutura do anel aromático (KATALINIC *et al.*, 2004). Segundo VILLANO *et al.* (2005) a actividade antioxidante dos flavan-3-óis aumenta com o aumento de grupos hidroxilo e com a esterificação com ácido gálico.

O quadro 3 mostra os valores de actividade antioxidante das quatro fracções obtidas. Os resultados mostram que a fracção F4 era aquela que apresentava uma maior contribuição para a actividade antioxidante dos vinhos. No entanto, a magnitude dos valores depende do método usado. Assim, se analisarmos os valores obtidos para a fracção F4, verifica-se que a percentagem da actividade antioxidante inicial dos vinhos, representa em média 33% (17-40%) para o método do DPPH, e 44% (34-54%) para o ABTS. De acordo com FERNANDEZ-PACHON *et al.* (2004), cerca de 50% da actividade antioxidante dos vinhos é devido aos compostos fenólicos poliméricos.

A fracção oligomérica apresenta uma actividade antioxidante ligeiramente superior à fracção F1, sendo a F2 aquela que, de acordo com os resultados obtidos, menos contribuiu para a actividade antioxidantes dos vinhos analisados.

Quadro 3 – Actividade antioxidante das fracções obtidas para os diferentes vinhos.

| | Actividade Antioxidante das diferentes fracções (mM trolox) | | | | | | | |
|----|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | DPPH | | | | ABTS | | | |
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F1 | F2 | F3 | F4 |
| V1 | 1,06±0,08* | 0,55±0,04 | 1,18±0,03 | 2,05±0,15 | 0,73±0,05 | 0,21±0,02 | 1,08±0,07 | 5,02±0,35 |
| V2 | 1,13±0,05 | 0,43±0,04 | 1,18±0,09 | 1,94±0,18 | 0,93±0,05 | 0,40±0,01 | 1,09±0,08 | 5,34±0,23 |
| V3 | 1,15±0,13 | 0,77±0,05 | 3,00±0,22 | 4,42±0,33 | 1,61±0,12 | 1,28±0,08 | 2,40±0,03 | 8,24±0,71 |
| V4 | 0,54±0,02 | 0,22±0,02 | 1,81±0,13 | 4,41±0,20 | 0,92±0,06 | 0,71±0,05 | 1,15±0,08 | 5,78±0,43 |
| V5 | 1,32±0,02 | 0,53±0,02 | 2,61±0,14 | 4,70±0,35 | 1,93±0,13 | 1,04±0,05 | 2,53±0,15 | 7,58±0,82 |

* média ± desvio padrão

A análise da figura 2, é possível verificar que somatório da actividade antioxidante das quatro fracções foi em todos os casos inferior à actividade antioxidante apresentada inicialmente pelos vinhos. No caso do método do DPPH, a soma da actividade antioxidante das 4 fracções varia entre 46 e 86% da actividade total dos vinhos. No caso do método do ABTS variam entre 50 e 81%. Estes valores são superiores aos descritos por FERNANDEZ-PACHON *et al.* (2004). Ainda segundo os mesmos autores, esta diferença pode ser explicada pela retenção de compostos fenólicos na mini-coluna de fraccionamento.

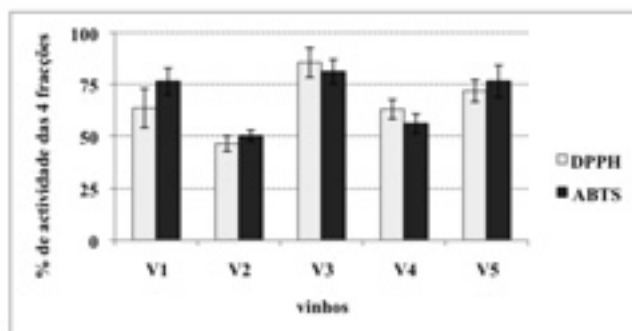


Figura 2 – Percentagem de actividade antioxidante do somatário das 4 fracções relativamente aos vinhos, para o método do DPPH e do ABTS.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que os vinhos apresentavam uma composição em compostos fenólicos, antocianinas e taninos totais bastante diversa.

Os valores quantificados de actividade antioxidante e de compostos fenólicos totais permitiram obter uma forte correlação entre estes dois parâmetros.

A fracção de compostos fenólicos poliméricos, nomeadamente antocianinas e proantocianidinas, era aquela que contribuía em maior percentagem para a actividade antioxidante total dos vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNUS A.; MAKRIS D.P.; KEFALAS P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.* 15: 655-665.
- BAOSHAN S.; LEANDRO M.C.; DE FREITAS V.; SPRANGER M.I. (2006). Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1128, 27-38.
- BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER M.E.; BERSET C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- FERNANDEZ-PACHON M.S.; VILLANO D.; GARCIA-PARRILLA M. C.; TRONCOSO A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 113-118.
- FERNÁNDEZ-PACHÓN M.S.; VILLANO D.; TRONCOSO A.M.; GARCÍA- PARRILLA M.C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563, 101-108.
- FRANKEL E.N.; WATERHOUSE A. L.; TEISSEDE P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidante activity in inhibition oxidation of low density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 890-894.
- GONÇALVES F.J. e JORDÃO A.M. (2009 a). Changes in antioxidant activity and proanthocyanidin fraction of red wine aged in contact with Portuguese (*Quercus pyrenaica* Willd.) and American (*Quercus alba* L.) oak wood chips. *Ital. J. Food Sci.* 21: 51-64.
- GONÇALVES F.J. e JORDÃO A.M. (2009 b). Influence of different commercial fining agents on proanthocyanidin fraction and antioxidant activity of a red wine from бага grapes. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 43: 111-120.
- KALT W.; FORNEY C.F.; MARTIN A.; PRIOR R. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4638-4644.
- KATALINIC V.; MILOS M.; MODUN D.; MUSIÉ I.; BOBAN M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in composition with (+)-catechin. *Food Chem.*, 86, 593-600.
- LACHMAN, J. et al., (2006). Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines. *Food Chem*,

- MILLER N.J.; RICE-EVANS C.A.; DAVIES M.J.; GOPINATHAN V.; MILNER, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84 407-412.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin) (2006). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et moûts. Edition Officielle. Paris.
- ORAK H.H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenol-oxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Sci. Hort.* 111: 235-241.
- SABOLOVICA N.; HUMBERTA A-N.; RADOMINSKA-PANDYAB A.; MAGDALOUA J. (2006). Resveratrol is Efficiently Glucuronidated by UDPGlucuronosyltransferases in the Human Gastrointestinal Tract and in Caco-2 Cells. *Biopharm. Drug Dispos.* 27: 181-189.
- SINGLETON V.L.; ROSSI A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Soleas G.; Grasse L.; Josephy P.; Goldberg D.; Diamandis E. (2002). Comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.*, 35, 119-124.
- VIRGILI M.; CONTESTABILE A. (2000). Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci. Lett.*, 281, 123-126.



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE VINAGRES COMERCIALIZADOS NO MERCADO PORTUGUÊS

Fernando J. GONÇALVES¹; Raquel R. RAMIREZ^{1*}; Sandra L. SANTOS¹, Ana C. CORREIA¹; António M. JORDÃO^{1,2**}

RESUMO

O objectivo do presente trabalho consistiu em avaliar a actividade antioxidante (recorrendo-se aos métodos DPPH e ABTS) e a composição fenólica de dez diferentes vinagres existentes no mercado Português (nomeadamente tendo em conta o tipo de matéria prima utilizada para a sua elaboração), assim como proceder à respectiva correlação entre os parâmetros analisados. Os resultados apontam para valores mais elevados em compostos fenólicos e de actividade antioxidante nos vinagres de vinhos tintos, de figo e de framboesa, comparativamente aos vinagres elaborados a partir de arroz, maçã, vinho branco, vinho espumante e de fruta. Em paralelo, foi também possível obter elevadas correlações entre os parâmetros fenólicos analisados e os valores da actividade antioxidante (independentemente do método de determinação utilizado).

Palavras-chave: Capacidade antioxidante, composição fenólica, vinagres de vinho.

1 – INTRODUÇÃO

É actualmente reconhecido, que as substâncias antioxidantes desempenham um importante papel na saúde humana, devido à sua capacidade em captarem os radicais livres que estão associados ao surgimento de várias doenças, como sejam a arteriosclerose, as doenças cardiovasculares, assim como várias das patologias de origem cancerígena (FRANKEL *et al.* 1993; TAPIERO *et al.* 2002). As frutas e os vegetais, assim como as bebidas produzidas a partir destas, evidenciam uma grande riqueza em compostos fenólicos, que por sua vez apresentam propriedades antioxidantes de grande relevância. Assim, o consumo destes produtos alimentares, como seja o vinho e os produtos elaborados a partir deste, caso do vinagre, apresentam, em associação com uma alimentação

¹ Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Alimentares, Estrada de Nelas, Quinta da Alagoa, Ranhados, 3500-606 Viseu, Portugal. * Estudante do Programa ERASMUS - Universidade de Burgos (Espanha).

² Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde do Instituto Politécnico de Viseu.

** Autor correspondente: antoniojordao@esav.ipv.pt

equilibrada, um efeito benéfico sobre a saúde humana devido à elevada riqueza em compostos fenólicos.

O vinagre é um produto obtido por fermentação acética de líquidos provenientes da fermentação alcoólica de substâncias de origem vegetal, como por exemplo o vinho. Em virtude da sua riqueza em compostos fenólicos, aos vinagres são atribuídos alguns efeitos potencialmente benéficos sobre a saúde. Vários autores, em trabalhos efectuados com ratos referem que o consumo de vinagre contribui para a redução dos problemas de hipertensão arterial (KONDO *et al.* 2001; DÁVALOS *et al.* 2005).

Apesar destes trabalhos, os estudos sobre a actividade antioxidante e a composição fenólica, têm sido centrados em alguns tipos de vinagres característicos de alguns países, como seja o caso dos vinagres balsâmicos oriundos de Itália (VERZELLONI *et al.* 2007). No caso português, existe um reduzido número de estudos sobre os vinagres comercializados em Portugal. Como tal, o objectivo do presente trabalho consistiu em avaliar a actividade antioxidante e a composição fenólica de diferentes vinagres, nomeadamente de vinagres elaborados a partir de vinho, comercializados no mercado nacional.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 10 diferentes vinagres existentes no mercado nacional, elaborados a partir de diferentes substâncias fermentadas de origem vegetal (considerando as informações disponíveis nos rótulos por parte dos produtores), em particular obtidos a partir de vinho. Os vinagres estudados foram adquiridos em triplicado directamente em várias superfícies comerciais.

Procedeu-se a uma caracterização fenólica, tendo sido determinados os teores em fenóis totais, fenóis flavonóides, antocianinas totais, taninos totais e ainda a absorvâncias a 420 e 520 nm, seguindo os procedimentos descritos pelo OIV (2006). Para a avaliação da actividade antioxidante total, recorreu-se a 2 métodos, DPPH e ABTS, seguindo as condições descritas por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e RE *et al.* (1999), respectivamente. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

Para tratamento dos resultados, efectuou-se uma análise de variância, tendo-se para tal recorrido ao teste LSD com o objectivo de comparar os valores médios obtidos (nível de significância de 5%), tendo-se para tal recorrido ao programa SPSS (versão 11.0).

3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No Quadro 1, são apresentados os valores médios obtidos referentes à caracterização fenólica efectuada aos vários vinagres objecto de estudo. Pelos resultados obtidos, é possível constatar a existência no geral de dois grandes grupos em termos da riqueza em compostos fenólicos. Assim, podemos constatar a existência de um grupo constituído pelos vinagres de vinho (excepto no vinagre de espumante), de framboesa e de figo, que apresentaram os valores mais elevados para generalidade dos parâmetros fenólicos analisados, e de um segundo grupo formado pelos vinagres de fruta, sidra, arroz e de vinho espumante, que apresentaram os valores mais baixos para a totalidade dos parâmetros de carácter fenólico estudados. No primeiro grupo os valores em compostos fenólicos totais variaram entre 105.8 (vinagre de vinho branco) e 1380.0 mg/L ac. gálico (vinagre Balsâmico de Módena), enquanto que no segundo grupo os valores para este parâmetro variaram entre 29.6 (vinagre de arroz) e 65.3 mg/L ac. gálico (vinagre de sidra). No caso dos valores em fenóis flavonóides, no primeiro grupo, os valores variaram entre 75.8 (vinagre de vinho branco) e 297.1 mg/L ac. gálico (vinagre Balsâmico), sendo que para o segundo grupo os valores foram significativamente mais baixos, variando entre 2.6 (vinagre de arroz) e 56.8 mg/L ac. gálico (vinagre de sidra).

Quadro 1 – Composição fenólica geral dos diferentes tipos de vinagres estudados.

| Parâmetros | Vinagres | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Vinho Branco | Vinho Tinto | Vinho Porto | Vinho Espumante | Fruta | Sidra | Figo | Balsâmico Módena | Arroz | Framboesa |
| Fenóis totais ⁽¹⁾ | 105.8 ^b (±2.0) | 444.9 ^d (±1.0) | 393.6 ^c (±3.6) | 56.0 ^a (±3.6) | 43.7 ^a (±10.7) | 65.3 ^a (±1.4) | 719.5 ^e (±10.7) | 1380.0 ^f (±1.7) | 29.6 ^a (±3.3) | 609.5 ^c (±10.4) |
| Polifenóis Flavonóides ⁽¹⁾ | 75.8 ^b (±5.8) | 251.1 ^d (±4.5) | 272.4 ^c (±17.9) | 50.1 ^a (±2.8) | 28.4 ^a (±3.0) | 56.8 ^a (±1.8) | 155.0 ^e (±8.1) | 297.1 ^f (±22.9) | 2.6 ^a (±0.3) | 242.8 ^c (±27.5) |
| Proteínas totais ⁽²⁾ | n.d. | 22.1 ^b (±1.1) | 39.4 ^b (±2.1) | n.d. | n.d. | n.d. | 18.2 ^a (±0.5) | 196.1 ^c (±1.9) | n.d. | 27.9 ^a (±0.1) |
| Amines totais ⁽²⁾ | -0.01 | 2.24 ^b (±0.11) | 0.90 ^b (±0.03) | -0.01 | -0.01 | -0.01 | 0.16 ^c (±0.01) | 1.66 ^b (±0.14) | -0.01 | 0.68 ^b (±0.02) |
| Abs. 420 nm ⁽³⁾ | 0.23 ^a (±0.01) | 1.02 ^b (±0.01) | 2.42 ^c (±0.02) | 0.09 ^a (±0.01) | 0.17 ^a (±0.02) | 0.14 ^a (±0.01) | 0.68 ^b (±0.04) | 2.92 ^c (±0.03) | 0.02 ^a (±0.00) | 1.59 ^b (±0.01) |
| Abs. 520 nm ⁽³⁾ | n.d. | 0.75 ^a (±0.01) | 2.18 ^b (±0.01) | n.d. | n.d. | n.d. | 0.22 ^c (±0.00) | 2.81 ^b (±0.01) | n.d. | 1.18 ^b (±0.03) |

⁽¹⁾ Expresso em mg/L equivalentes de ácido gálico; ⁽²⁾ Expresso em mg/L equivalentes de malvidina-3-glucósido;

⁽³⁾ Expresso em g/L;

⁽⁴⁾ Células de 1 cm de percurso óptico. Valores médios seguidos da mesma letra para a mesma linha não são significativamente diferentes ($p < 0.05$). N.d. não determinado.

A tendência verificada para os diversos vinagres ao nível da composição fenólica, está de acordo com resultados anteriormente publicados por outros autores, nomeadamente ao nível dos vinagres de vinho tinto (VERZELLONI *et al.* 2007). Estes autores, obtiveram também valores mais elevados nos vinagres Balsâmicos ao nível dos teores em fenóis totais e de fenóis flavonóides, comparativamente a outros vinagres de vinho tinto. Os resultados obtidos permitem considerar que a origem dos fermentados a partir dos quais se elabora os vinagres será um dos factores que irão determinar os teores em compostos fenólicos que os vinagres poderão apresentar.

Os valores obtidos, ao nível dos fenóis totais nos vinagres de vinho branco e tinto estudados, são no entanto ligeiramente inferiores aos doseados por DÁVALOS *et al.* (2005) em vinagres de vinho tinto (elaborados a partir de vinhos da casta *Cabernet Sauvignon*) e de vinho branco. Por outro lado, ALONSO *et al.* (2004) estudaram a influência do envelhecimento de vinagres de vinho em contacto com a madeira de carvalho, tendo concluído que é o tipo de vinho de base utilizado, o factor determinante no conteúdo em fenóis presente nos vinagres de vinho. Existem ainda autores (XU *et al.* 2004), que consideram a existência de uma relação entre os valores da absorvência a 420 nm e a actividade antioxidante dos vinagres. No caso dos vinagres analisados no presente trabalho, essa evidência foi observada excepto no caso do vinagre de figo, o que eventualmente poderá ser uma consequência do processo de clarificação ao qual este vinagre possa ter sido sujeito e como tal, podendo essa clarificação ter contribuído para a redução do número de compostos responsáveis pela cor castanha. De salientar por outro lado, que alguns aditivos colocados nos vinagres poderão também contribuir para o incremento da cor dos vinagres, como seja o caso da adição do caramelo de sulfito de amónio (designado nos rótulos por E150d) usado nos vinagres balsâmicos.

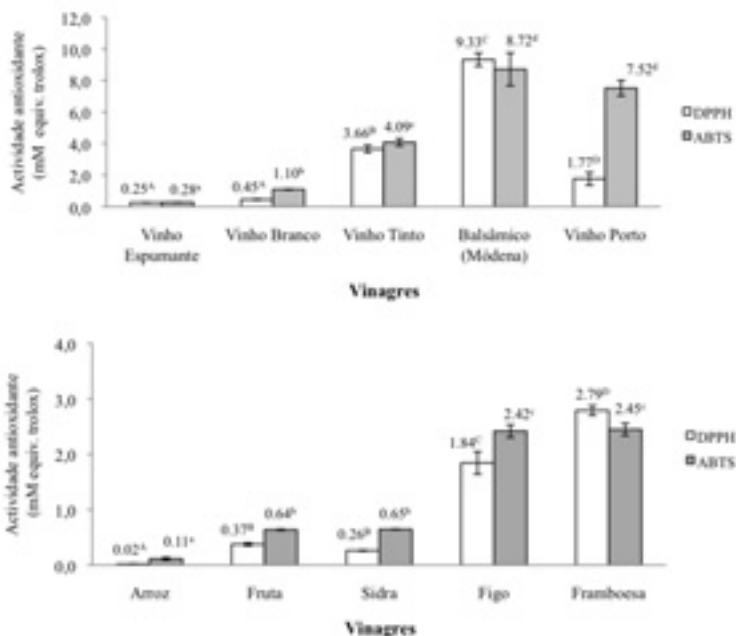


Figura 1 – Valores médios da actividade antioxidante total nos diversos vinagres comerciais estudados recorrendo a dois métodos de determinação (DPPH e ABTS). * Valores médios seguidos da mesma letra para o mesmo método de determinação não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A actividade antioxidante dos produtos derivados das uvas e dos vinhos, como é o caso dos vinagres é influenciada, não só pelos teores em polifenóis, mas também pelos diversos tipos de compostos fenólicos. Estes factores são por sua vez influenciados pelo tempo e pelas condições de conservação, pelas castas utilizadas, pelos aditivos usados e ainda pelas técnicas de vinificação.

Na figura 1, encontram-se apresentados os valores da actividade antioxidante obtidos nos vários vinagres objecto de estudo. Os resultados obtidos apresentam a mesma tendência evidenciada na composição fenólica apresentada no Quadro 1. Assim, foram os vinagres elaborados a partir de vinho (em particular de castas tintas), de figo e de framboesa, os que apresentaram valores de actividade antioxidante significativamente mais elevados, tendo os valores variado entre 1.77 e 9.33 mM equivalentes de trolox

(método DPPH), e entre 2.42 e 8.72 mM equivalentes de trolox (método ABTS). Na totalidade dos vinagres estudados, foi o vinagre Balsâmico de Modena, aquele que apresentou os valores mais elevados de actividade antioxidante (9.33 e 8.72 mM equivalentes de trolox, respectivamente pelo método DPPH e ABTS). Esta tendência está de acordo com os resultados apresentados por VERZELLONI *et al.* (2007), que compararam os valores da actividade antioxidante (recorrendo aos métodos ABTS e FRAP) de diversos vinagres de vinho tinto, entre os quais vinagres Balsâmicos. Esta preponderância, deste tipo de vinagres sob os restantes, está segundo estes autores, directamente relacionada com o facto de estes vinagres serem envelhecidos em barricas de madeira de carvalho e de ocorrer uma evaporação da fracção aquosa ao longo do tempo, e como tal conduzir a uma concentração do produto final.

Por último considerar ainda que de acordo com a informação apresentada no rótulo dos diversos vinagres estudados, aos mesmos foram adicionados aditivos que poderão potenciar as propriedades antioxidantes naturalmente presentes nos vinagres, como seja o caso de sulfuroso. Assim, as diferenças encontradas em termos da actividade antioxidante dos vinagres estudados, não poderão estar só associadas à origem vegetal a partir das quais os vinagres foram elaborados, mas também aos tipos e quantidades de aditivos adicionados na elaboração dos mesmos.

De forma a analisar a relação entre alguns dos parâmetros fenólicos apresentados anteriormente no Quadro 1 e a actividade antioxidante, efectuou-se a determinação dos coeficientes de correlação linear entre os vários parâmetros estudados para todos os vinagres objecto de estudo (Quadro 2).

Os resultados obtidos evidenciam a existência no geral de elevadas correlações, em particular a correlação estabelecida entre as antocianias totais e a actividade antioxidante.

Quadro 2 – Coeficientes de correlação linear entre a actividade antioxidante total e a composição fenólica nos diversos vinagres comerciais estudados.

| Parâmetros | Coeficientes de correlação (R ²) | |
|----------------------|--|------|
| | Métodos ABTS | DPPH |
| Taninos totais | 0.58 | 0.55 |
| Fenóis totais | 0.57 | 0.62 |
| Fenóis flavonóides | 0.50 | 0.76 |
| Antocianinas totais | 0.91 | 0.90 |
| Absorvância a 420 nm | 0.92 | 0.67 |

O facto de em alguns dos parâmetros, os valores dos coeficientes de correlação não terem sido muito elevados, poderá de acordo com DÁVALOS *et al.* (2005), ficar a dever-se ao facto da fermentação acética conduzir a um decréscimo dos teores em compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante e/ou conduzir à formação de novos compostos fenólicos nos vinagres que por sua vez apresentam menor actividade antioxidante relativamente aos inicialmente presentes (por exemplo nos vinhos de base utilizados).

4 – CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível efectuar uma análise do potencial antioxidante presente em diversos vinagres disponíveis no mercado nacional, em particular em vinagres de vinho. Os resultados evidenciaram a existência de uma grande variabilidade em termos da composição fenólica assim como da actividade antioxidante presente nos diferentes vinagres. Foi também possível constatar que os vinagres de vinho (balsâmico, porto e tinto) foram os que apresentaram os valores mais elevados ao nível dos parâmetros analisados em paralelo com os vinagres de figo e de framboesa.

Estes resultados poderão contribuir para que este produto alimentar, não seja unicamente considerado como um produto exclusivamente usado para fins meramente culinários de satisfação sensorial, mas também poder ser usado como um complemento à

alimentação rica e variada em frutas, legumes e bebidas ricas em polifenóis, contribuindo deste modo, para o aumento da ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO A.M.; CASTRO R.; RODRÍGUEZ M.C.; GUILLÉN D.A.; BARROSO C.G. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Res. Int.* 37: 715-721.
- BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER M.E.; BERSET C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28: 25-30.
- DÁVALOS A.; BARTOLOMÉ B.; GÓMEZ-CORDOVES C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chem.* 93: 325-330.
- FRANKEL E.N.; KANNER J.; GERMAN J.B.; PARKS E.; KINSELLA J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341: 454-457.
- KONDO S.; TAYAMA K.; TSUKAMOTO Y.; IKEDA K.; YAMORI Y. (2001). Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2690-2694.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) (2006). Recueil des Méthodes Internationales d'analyse des vins et moûts². Edition Officielle. Paris.
- RE R.; PELLEGRINI N.; PROTEGGENTE A.; PANNALA A.; YANG M.; RICE-EVANS C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- TAPIERO H.; TEW K.D.; NGUYEN B.A.G.; MATHÉ G. (2002). Polyphenols: Do they play a role in prevention of human pathologies ?. *Biomed. Pharm.* 56: 200-207.
- VERZELLONI E.; TAGLIAZUCCHI D.; CONTE A. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* 105: 564-571.
- XU Q.P.; AO Z.H.; TAO W.Y. (2004). Antioxidative activity of Henghun aromatic vinegar extracts. *China Brewing* 7: 16-18.

A ANÁLISE MINERAL DE VINHOS. METODOLOGIAS IMPLEMENTADAS NO LABORATÓRIO DO INIA-DOIS PORTOS

Sofia CATARINO¹; António Sérgio CURVELO-GARCIA¹

RESUMO

A análise mineral de mostos de vinhos é requerida com frequência no âmbito do controlo da qualidade, nas suas vertentes tecnológica, sensorial, de segurança alimentar e legal. Identificam-se as principais razões que justificam o controlo de elementos minerais no vinho, na perspectiva do produtor/enólogo. A aplicação de técnicas de análise multi-elementar e isotópica, com progressivo abaixamento dos limites de detecção e de quantificação dos métodos, permitindo quantificar cada vez mais elementos no vinho, abriu novos campos de investigação. Apresenta-se informação sistematizada sobre os métodos analíticos indicados pela OIV e sobre os métodos implementados no Laboratório de Análise Mineral do INIA-Dois Portos. São discutidas as potencialidades, vantagens e desvantagens das diferentes técnicas analíticas (FAAS, ETAAS e ICP-MS) e apresentados resultados da participação do INIA-Dois Portos num ensaio colaborativo da OIV para determinação de metais em vinhos por ICP-MS.

Palavras-chave: Vinho, análise mineral, métodos de análise, AAS, ICP-MS.

1 - ANÁLISE MINERAL: RAZÕES PARA A SUA REALIZAÇÃO

O vinho apresenta na sua composição várias dezenas de elementos químicos em concentrações muito diversas, os quais apresentam diferentes níveis de importância sob o ponto de vista enológico. O conhecimento dos teores de vários desses elementos, ao longo das diferentes etapas de produção, é fundamental no âmbito tecnológico, da qualidade organoléptica, da segurança alimentar, e face às restrições legais vigentes (CATARINO *et al.*, 2008). De seguida identificam-se as principais razões, na perspectiva do produtor/enólogo que justificam o controlo de elementos minerais no vinho:

¹ Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP, INIA–Dois Portos. Quinta de Almoínha, 2565-191 Dois Portos, Portugal. E-mail: evn.sofia.catarino@mail.net4b.pt; sofia.catarino@inrb.pt

Pela sua importância ponderal, elementos tais como sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca), são os principais responsáveis pela estrutura metálica dos vinhos e pela sua capacidade tampão ácido-base. Dependendo da concentração em que se apresentam, determinados metais podem originar fenómenos depreciativos da qualidade do vinho, tais como oxidações, turvações e precipitações. Potássio, Ca, ferro (Fe) e cobre (Cu) são exemplos clássicos, no âmbito da química enológica, de elementos envolvidos nos referidos fenómenos de instabilidade físico-química, mas outros elementos podem estar envolvidos, como por exemplo o alumínio (Al) e o zinco (Zn). Estes últimos elementos, quando em concentrações elevadas, podem igualmente estar na origem de aromas e gostos desagradáveis. Outros, como por exemplo Na, em ligação com o teor de cloro (Cl), fornecem informação para o controlo e detecção de práticas enológicas não autorizadas. O conhecimento da concentração de alguns elementos essenciais nos mostos é igualmente importante, tendo em conta os efeitos da sua carência na actividade de leveduras e bactérias lácticas. Em determinadas situações, justifica-se o controlo do teor de metais pesados nos mostos, uma vez que quando em concentrações elevadas influenciam a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica (CATARINO *et al.*, 2007). Finalmente, justifica-se ainda esse controlo por razões que se relacionam com o cumprimento das restrições legais existentes. Actualmente, a Organização Internacional da Vinha e do Vinho estabelece limites máximos admissíveis para os teores de alguns elementos nos vinhos (OIV, 2009). O potencial contributo do vinho para a dieta humana enquanto fornecedor de elementos essenciais, constitui outra perspectiva sobre a importância da composição mineral do vinho e sua caracterização.

A aplicação de técnicas de análise multi-elementar e isotópica, com progressivo abaixamento dos limites analíticos dos métodos, permitindo quantificar cada vez mais elementos no vinho, abriu novas perspectivas de investigação sobre a composição mineral do vinho. A informação sobre a composição elementar e isotópica do vinho tem sido explorada com o objectivo de garantir a origem geográfica e, nesse sentido, a autenticidade do vinho (CATARINO e CURVELO-GARCIA, 2009). Por outro lado, os avanços nas técnicas analíticas instrumentais, concretamente a possibilidade de acoplamento de técnicas, potenciaram o estudo de fenómenos de complexação de iões metálicos, com outras espécies químicas do vinho (polissacáridos, polifenóis, proteínas).

2 - DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

Diversas técnicas têm sido utilizadas no doseamento de metais no vinho, com especial destaque para as técnicas espectrométricas. Os métodos de análise para a determinação de metais em vinhos indicados pela OIV, e adoptados pela União Europeia, baseiam-se essencialmente na espectrofotometria de absorção atómica (AAS), com chama (FAAS) e com atomização electrotérmica (ETAAS). A técnica de FAAS é indicada nos métodos de referência para doseamento de K, Na e Fe (após remoção do álcool), e método único para determinação de Ca, Cu, Mg, Zn (após remoção do álcool), e prata (Ag) (após mineralização da amostra) (OIV, 2009). Relativamente a Cu, esta técnica permite avaliar a legalidade do vinho (limite máximo admissível é 1 mg/L), mas no entanto evidencia manifestas dificuldades na quantificação de Cu na generalidade dos vinhos.

O método de referência para doseamento de arsénio (As) baseia-se na ETAAS com gerador de hidretos. Actualmente, no que se refere ao doseamento de chumbo (Pb) em vinhos, a OIV define os critérios de desempenho que o método a aplicar na quantificação deste metal pesado deverá cumprir. Como exemplos, são apresentados métodos que se baseiam em ETAAS, técnica que é também suporte do método único apresentado pela OIV para a determinação de cádmio (Cd). Finalmente, o doseamento de boro (B) é realizado por aplicação de um método colorimétrico, e o de mercúrio (Hg) por espectrometria de fluorescência atómica.

A FAAS é relativamente vulgar nos laboratórios de Enologia, apresentando baixos custos de investimento e de funcionamento face às alternativas, e facilidade de operação. É uma técnica altamente específica e assegura boa precisão dos resultados. Apresenta contudo uma capacidade de detecção limitada (limites de detecção ao nível de sub mg/L), considerando o intervalo de concentrações encontrado no vinho. O método das adições, por vezes utilizado, apresenta reduzida precisão entre outras desvantagens (MILLER e MILLER, 1993). Por outro lado, a opção pela pré-concentração da amostra diminui a praticabilidade dos métodos.

A técnica de ETAAS apresenta elevada sensibilidade, baixos limites de detecção (apropriados para análise vestigial), livre de interferências espectrais, exigindo uma preparação mínima da amostra. É sujeita a interferências químicas, sendo a sua gama de

trabalho limitada. Permite elevada produtividade, não tão elevada como a FAAS, e com menor precisão do que a última, com custos inferiores aos da técnica de ICP-MS. Quando é necessária informação apenas sobre um elemento, constitui uma excelente alternativa às técnicas multi-elementares de espectrometria de emissão com plasma acoplado por indução (ICP-OES) e de espectrometria de massa com plasma acoplado por indução (ICP-MS).

A aplicação da técnica de ICP-OES, pouco vulgarizada em laboratórios de enologia, sendo apropriada para o doseamento de um conjunto alargado de elementos, apresenta limitações para elementos vestigiais (limites analíticos entre 1 e 10 $\mu\text{g/L}$, para a generalidade dos elementos) (ACETO *et al.*, 2002).

A técnica de ICP-MS apresenta como grandes vantagens a análise multi-elementar e isotópica, selectividade e sensibilidade elevadas, excelentes limites analíticos (tipicamente inferiores a 0,01 $\mu\text{g/L}$), gama de trabalho bastante alargada, elevada produtividade, sendo aplicada cada vez com mais frequência na caracterização de vinhos. É uma técnica afectada por interferências espectrais e interferências não espectrais relacionadas com efeitos de matriz. Possibilita diferentes procedimentos de quantificação (modo quantitativo e semi-quantitativo) de acordo com a exactidão e precisão requeridas. É ainda pouco usual nos laboratórios de enologia, devido aos custos envolvidos e à considerável especialização que exige principalmente na fase de desenvolvimento de métodos. Não sendo ainda referida no compêndio de métodos de análise de vinhos e mostos da OIV, foram recentemente promovidos por esta organização dois ensaios colaborativos, envolvendo mais de uma dezena de laboratórios europeus, para avaliação das características de um método ICP-MS para a doseamento de metais em vinhos.

De utilização ainda menos vulgarizada, diversas técnicas electroquímicas têm sido aplicadas na análise mineral de vinhos: voltametria de redissolução e potenciometria de redissolução, potenciometria com eléctrodo selectivo e polarografia (FOURNIER *et al.*, 1998).

3 - METODOLOGIAS IMPLEMENTADAS NO LABORATÓRIO DO INIA-DOIS PORTOS

No Quadro 1 apresenta-se informação sistematizada sobre os parâmetros analisados no Laboratório de Análise Mineral do INIA-Dois Portos, técnicas analíticas aplica-

das, referências dos métodos de análise e algumas das suas figuras de mérito. Por FAAS é possível realizar o doseamento de Ca, Fe, Mg, K e Na. Alumínio, Cd, Pb, cobalto (Co) e Cu podem ser determinados por ETAAS. Com recurso à técnica de ICP-MS, encontra-se implementado um método quantitativo para determinação de 26 elementos contaminantes dos vinhos, em particular dos elementos objecto de controlo legal. Com recurso a um método semi-quantitativo é possível obter informação sobre cerca de 60 elementos, com um erro associado inferior a 20% para a maioria dos analitos. A abordagem semi-quantitativa, menos exacta mas mais rápida que a abordagem quantitativa, pode ser extremamente útil quando se pretende comparar amostras ou obter informação sobre o perfil mineral de uma determinada amostra. Actualmente no Laboratório de Análise Mineral do INIA-Dois Portos é o único laboratório de enologia nacional que dispõe de um equipamento de ICP-MS.

Quadro 1 – Parâmetros analíticos e métodos de análise implementados no Laboratório de Análise Mineral do INIA-Dois Portos

| Parâmetro Analítico (referência) | Técnica analítica | Características do método de análise | | |
|-------------------------------------|----------------------|--|--------------------|--|
| | | Limite de deteção ($\mu\text{g/L}$, excepto Ca, Na, Fe, K, Mg - mg/L) | Recuperação (%) | Repetibilidade (% coeficiente de variação) |
| Alumínio ¹ | ETAAS | 1 | 96 – 105 | 1,5 – 2,6 |
| Alumínio ² | ICP-MS | 0,1 | 93 – 100 | 0,2 – 4 |
| Arsénio ² | ICP-MS | 0,002 | 95 – 98 | 0,2 – 4 |
| Bário ² | ICP-MS | 0,002 | 81 – 109 | 0,2 – 4 |
| Berílio ² | ICP-MS | 0,001 | 89 – 98 | 0,2 – 4 |
| Bismuto ² | ICP-MS | 0,001 | 88 – 93 | 11 |
| Cádmio ³ | ETAAS | 0,05 | 92 – 110 | 0,9 – 1,7 |
| Cádmio ² | ICP-MS | 0,002 | 82 – 83 | 0,2 – 4 |
| Cálcio ⁴ | FAAS | 0,1 | 99 – 104 | 0,3 – 1,1 |
| Césio ² | ICP-MS | 0,0003 | 89 – 98 | 0,2 – 4 |
| Chumbo ⁴ | ETAAS | 2 | 94 – 110 | 1,5 – 3,0 |
| Chumbo ² | ICP-MS | 0,001 | 92 – 99 | 0,2 – 4 |
| Cobalto ⁵ | ETAAS | 0,4 | 84 – 100 | 0,4 – 4,6 |
| Cobalto ² | ICP-MS | 0,0004 | 91 – 93 | 0,2 – 4 |
| Cobre ⁶ | ETAAS | 1 | 93 – 100 | 1 – 3 |
| Cobre ² | ICP-MS | 0,01 | 91 – 97 | 0,2 – 4 |
| Estrôncio ² | ICP-MS | 0,002 | 98 | 0,2 – 4 |

| | | | | |
|-----------------------|--------|--------|-----------|-----------|
| Ferro ⁷ | FAAS | 0,16 | 91 – 102 | 0,5 – 3,5 |
| Ferro ² | ICP-MS | 0,0002 | 96 – 110 | 0,2 - 4 |
| Gálio ² | ICP-MS | 0,002 | 85 – 88 | 10 |
| Índio ² | ICP-MS | 0,0002 | 83 – 84 | 8 |
| Lítio ² | ICP-MS | 0,003 | 88 – 97 | 0,2 - 4 |
| Magnésio ⁴ | FAAS | 0,008 | 93 – 100 | 0,5 – 1,4 |
| Manganês ² | ICP-MS | 0,001 | 104 – 105 | 0,2 - 4 |
| Mercurio ² | ICP-MS | 0,01 | 99 – 100 | 0,2 - 4 |
| Níquel ² | ICP-MS | 0,006 | 99 – 102 | 0,2 - 4 |
| Potássio ⁸ | FAAS | 2 | 91 – 105 | 0,4 - 0,9 |
| Rubídio ² | ICP-MS | 0,001 | 96 – 103 | 0,2 - 4 |
| Selénio ² | ICP-MS | 0,01 | 89 – 98 | 11 |
| Sódio ⁹ | FAAS | 1,2 | 102 – 104 | 0,3 – 3,4 |
| Tálio ² | ICP-MS | 0,0003 | 91 – 94 | 0,2 - 4 |
| Urânio ² | ICP-MS | 0,003 | 104 – 106 | 0,2 - 4 |
| Vanádio ² | ICP-MS | 0,001 | 101 – 102 | 0,2 - 4 |
| Zinco ² | ICP-MS | 0,02 | 95 – 97 | 0,2 - 4 |

3.1 - Participações em ensaios colaborativos internacionais

Ao longo dos últimos anos foram diversas as participações em ensaios colaborativos internacionais. A título de exemplo, e pelo seu contributo para a definição de métodos de análise para vinhos e mostos no âmbito da OIV, referem-se os seguintes:

- Validação do método para determinação de Pb em vinhos por ETAAS. Informação utilizada na definição de critérios para os métodos para determinação de Pb em vinho (OIV, 2009);

¹ CATARINO *et al.* (2002); ² CATARINO *et al.* (2006);

³ CATARINO e CURVELO GARCIA (1999);

⁴ OIV (2009);

⁵ CATARINO *et al.* (2009);

⁶ CATARINO *et al.* (2005);

⁷ NP 2280;

⁸ NP 3685;

⁹ NP 3594.

Determinação de metais em vinhos por ICP-MS, ensaios MV-1/08 e MV-1/09. Seguidamente apresentam-se alguns resultados da participação no ensaio MV-1/09, para avaliação dos parâmetros fundamentais de funcionamento de um método de análise de metais por ICP-MS, baseado no método descrito na FV 1265 (OIV, 2007), e estabelecimento das suas características, fundamentalmente no que se refere à precisão (repetibilidade e reprodutibilidade). Participaram no ensaio 10 laboratórios europeus (Alemanha, Espanha, França, Portugal e República Checa). Foram ensaiadas 16 amostras codificadas de A a P: 4 amostras de vinho tinto (D-M, H-J), 4 amostras de vinho Porto (B-K, E-L), 6 amostras de vinho branco (F-N, C-I, A-O) e 2 amostras de vinho Champanhe (G-P) (Quadro 2). Diferentes níveis analíticos foram obtidos mediante selecção de amostras com concentrações naturais dos analitos objecto do ensaio, e mediante a adição de padrões de concentração conhecida, sobre as amostras naturais. Para cada amostra existia uma outra idêntica (duplicado), codificada de diferente forma (informação não conhecida dos participantes). O delineamento do ensaio, tratamento de dados, resultados e discussão encontram-se descritos sob forma de relatório.

4 - CONCLUSÕES

Os métodos de análise anteriormente apresentados fornecem informação sobre o teor total do elemento, independentemente da(s) forma(s) química(s) em que este encontra. A evolução da análise mineral de vinhos deverá contemplar o desenvolvimento de metodologias que permitam, com maior facilidade, a especiação dos elementos de interesse enológico e investigação dos fenómenos de complexação dos iões metálicos com outras espécies químicas do vinho.

Quadro 2 – Alguns resultados da participação do INIA-Dois Portos no ensaio colaborativo da OIV para determinação de metais em vinhos por ICP-MS - (MV-1/09)

| Amostras | | Concentrações iniciais | | | | R |
|---------------------|-----|------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|
| | | Adições (mg/L) | | | | |
| | | <i>As</i> | <i>Co</i> | <i>Cu</i> | <i>Fe</i> | <i>As</i> |
| <i>Vinho Branco</i> | F-N | 0,011 | <0,02 | 0,19 | 0,82 | 11,2 ± 0,5 (15,49) |
| | C-I | 0,010 | 0,005 | 0,5 | 1 | 24,3 ± 0,2 (27,15) |
| | A-O | 0,025 | 0,010 | 1 | 2 | 42 ± 2 (46,25) |
| <i>Porto</i> | B-K | 0,006 | 0,011 | 0,24 | 1,44 | 9,2 ± 0,4 (11,01) |
| | E-L | 0,050 | 0,020 | 1,5 | 3 | 78 ± 10 (80,4) |
| <i>Vinho Tinto</i> | D-M | <0,01 | <0,02 | 0,14 | 2,9 | 2,26 ± 0,08 (4,3) |
| | H-J | 0,100 | 0,050 | 2 | 5 | 102,4 ± 0,7 (113,23) |
| <i>Champanhe</i> | G-P | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,89 ± 0,05 (4,42) |

* Média das concentrações dos duplicados ± desvio padrão correspondente;

** Média dos valores médios (fornecidos pelos laboratórios participantes) após eliminação de anómalos.

| Resultados INIA Dois Portos* (Valor de referência)** (As, Co - µg/L; Cu, Fe – mg/L) | | | Recuperação (MV-1/09) (%) | | | |
|---|--------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Co</i> | <i>Cu</i> | <i>Fe</i> | <i>As</i> | <i>Co</i> | <i>Cu</i> | <i>Fe</i> |
| 12,1 ± 0,8 (11,58) | 0,14 ± 0,01 (0,16) | 0,92 ± 0,04 (1,1) | - | - | - | - |
| 19,25 ± 0,08 (18,72) | 0,705 ± 0,007 (0,74) | 2,02 ± 0,02 (2,13) | 117 | 142 | 116 | 104 |
| 24 ± 2 (22,37) | 1,065 ± 0,007 (1,14) | 3,2 ± 0,3 (3,18) | 123 | 108 | 98 | 105 |
| 9,0 ± 0,6 (7,79) | 0,185 ± 0,007 (0,21) | 1,5 ± 0,1 (1,56) | - | - | - | - |
| 28 ± 4 (26,92) | 1,6 ± 0,2 (1,68) | 4,34 ± 0,4 (4,3) | 139 | 96 | 97 | 91 |
| 2,81 ± 0,07 (2,9) | 0,12 (0,14) | 2,63 ± 0,01 (3,09) | - | - | - | - |
| 43,9 ± 0,2 (48,63) | 1,745 ± 0,007 (2,05) | 6,73 ± 0,09 (7,75) | 73 | 92 | 96 | 93 |
| 1,665 ± 0,007 (1,83) | 0,035 ± 0,007 (0,042) | 0,635 ± 0,007 (0,83) | - | - | - | - |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACETO M., ABOLLINO O., BRUZZONOTI M.C., MENTASTI E., SARZANINI C., MALAN-DRINO M., 2002. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food Additives and Contaminants*, **2**, 126-133.
- CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., 1999. Les teneurs en plomb et en cadmium de quelques vins portugais. *Feuillet Vert de l'OIV*, **1081**.
- CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., BRUNO DE SOUSA R., 2002. Determination of aluminum in wine by graphite furnace AAS: Validation of Analytical Method. *Atomic Spectroscopy*, **23** (6), 196-200.
- CATARINO S., PIMENTEL I., CURVELO-GARCIA A.S., 2005. Determination of copper in wine by ETAAS using conventional and fast thermal programs: validation of analytical method. *Atomic Spectroscopy*, **26** (2), 73-78.
- CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., BRUNO DE SOUSA R., 2006. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison of two calibration approaches. *Talanta*, **70**, 1073-1080.
- CATARINO S., BALEIRAS-COUTO M.M., BRAZ R., CURVELO-GARCIA A.S., 2007. Influência e eliminação do cobre e do chumbo na fermentação alcoólica. In *proceedings of: 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo* (vol. 2), 73-81, Évora.
- CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., BRUNO DE SOUSA R., 2008. Elementos contaminantes nos vinhos (revisão). *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **23** (1), 3-19.
- CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., 2009. A composição multi-elementar e razões isotópicas como marcadores da origem geográfica de vinhos. In: 1º Congresso Internacional dos Vinhos do Dão, Viseu.
- CATARINO S., NEVES A., BRUNO DE SOUSA R., 2009. Determination of cobalt in wine and must by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry: analytical method development and validation. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **24** (2), 65-72.
- FOURNIER J.-B., HIRSCH O., MARTIN G.J., 1998. Analyse du zinc, du cuivre et du plomb dans le vin. Rapport entre les concentrations totales analysées para spectrométrie d'absorption atomique et les concentrations des ions libres déterminées par polarographie. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **32** (1), 45-50.

MILLER J.C., MILLER J.N., 1993. *Statistics for analytical chemistry*, 3rd edition, 233 p, Ellis Horwood, PTR Prentice Hall Analytical Chemistry Series.

OIV, 2007. Analyse multiélémentaire para ICP/MS. *Feuillet Vert de l'OIV*, **1265** (CII-SCMA 03.2007-23).

OIV, 2009. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine and Wine, Paris.



EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O PROCESSO DE SECAGEM PÓS COLHEITA DE UVAS

PEDRO XIMÉNEZ

María de las Nieves LÓPEZ DE LERMA; José PEINADO;
Juan J. MORENO; Rafael A. PEINADO

RESUMO

Os mostos de uvas secas pós colheita e os extractos etanólicos do bagaço foram divididos pela extracção em fase sólida; foram determinados os compostos fenólicos e a actividade antioxidante. A análise através da cromatografia de filtração em gel, do mosto de uva em fases diferentes do processo de secagem, mostrou que são formados compostos de elevado peso molecular e que estes são particularmente responsáveis pela actividade antioxidante e desenvolvimento da cor acastanhada nas uvas. A actividade antioxidante dos extractos apresentou valores similares aos obtidos nos mostos no final do processo de secagem; contudo, os compostos fenólicos e o índice de acastanhamento dos extractos apresentou uma diminuição de 30% e 50% respectivamente, em relação aos observados nos mostos correspondentes. Estes resultados sugerem que os extractos etanólicos poderiam ser utilizados como uma fonte de compostos fenólicos, aumentando a actividade antioxidante dos vinhos resultantes e evitando o aumento do acastanhamento.

Palavras-chave: Actividade antioxidante, uvas passas, bagaço de uva, secagem pós colheita, fracção fenólica, vinho doce.

1. INTRODUÇÃO

As uvas contêm uma grande quantidade de diferentes compostos fenólicos na película, polpa e sementes, que são parcialmente extraídos durante a vinificação (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2000). Os fenóis têm efeitos benéficos para a saúde realçando a actividade antioxidante (LANDRAULT, *et al.* 2001). Os mostos das uvas tintas são fermentados com película, mas no processo de vinificação de uvas brancas, as películas, e os fenóis que contém, são retirados.

Hoje em dia, a maceração pré fermentativa do mosto branco com película é utilizada para melhorar o potencial aromático e a qualidade do vinho (PEINADO, *et al.* 2004). Outras práticas de vinificação foram descritas como uma forma de melhorar a

extracção de fenóis das uvas brancas. De facto, FUHRMAN, *et al.* (2001) concluiu que a transformação de vinho branco através da imposição do contacto, por um curto período de tempo, da película da uva com o mosto em fermentação conduz à extracção dos fenóis da película da uva e dá origem a vinhos brancos, ricos em polifenóis com características antioxidantes semelhantes às do vinho tinto. Contudo, os fenóis contribuem para o sabor amargo e a adstringência, podendo agir como substratos de oxidação. Assim sendo, uma grande extracção de tais compostos pode afectar negativamente as características sensoriais dos vinhos brancos. Na região vinícola de Montilla-Moriles (Sul de Espanha) os vinhos doces são obtidos a partir de uvas secas tal como descrito (FRANCO *et al.* 2004). O mosto de cachos secos é complementado com etanol e o vinho resultante é denominado de Pedro Ximénez (PX). O bagaço de uva é utilizado para a produção de vinagre, para compostagem ou para obter outros produtos derivados. O objectivo deste trabalho é estudar as diferentes fracções polifenólicas do mosto das uvas em diferentes fases de secagem e a sua relação com a actividade antioxidante. Adicionalmente, avaliámos se os extractos etanólicos obtidos do bagaço de uva seca poderiam ser utilizados para aumentar a actividade antioxidante dos vinhos doces Pedro Ximénez.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem e preparação das uvas

Foram recolhidas amostras aleatórias de uvas sãs de pelo menos dez locais diferentes da *pasera* mais elevada (local de secagem) da região vinícola de Montilla-Moriles para preparar uma amostra de 20 kg de uvas. As amostras foram recolhidas dos locais seleccionados depois de 0, 1, 2, 3, 5 e 7 dias de secagem e foram processadas de imediato no laboratório. As uvas vinificadas foram prensadas e o mosto resultante foi clarificado por centrifugação e preservado a -20°C . Os bagaços de uva foram congelados a -20°C . 10 gramas de bagaço de uva foram tratados com 20 ml de etanol durante 24 h num triturador giratório (velocidade de 30 rpm) a 30°C . O extracto etanólico obtido foi clarificado por centrifugação a $12000 \times g$ durante 10 min.

2.2. Filtração em gel das uvas do mosto

As colunas NAP-10 (GE Healthcare) foram utilizadas de acordo com as especificações do fabricante para obter duas fracções, a primeira com compostos de elevado peso molecular (Elevado PM) e a segunda com moléculas mais pequenas (Baixo Peso Molecular).

2.3. Extração fenólica a partir das uvas do mosto e do bagaço

Os compostos fenólicos foram isolados pela passagem através da coluna SepPack tC-18 e foram obtidas quatro fracções. A primeira fracção (fracção I) contém ácidos fenólicos não absorvidos depois de duas lavagens na coluna com 2.5 ml de água com um pH de 7. O pH da coluna foi ajustado para 2 através da lavagem com 5 mL de água a um pH 2; a solução separada foi também analisada (fracção II). De seguida, foram adicionados 2 x 2,5 mL de acetonitrilo 16% com um pH 2 para separar as catequinas e procianidinas (fracção III). Por último, as procianidinas poliméricas (fracção IV) foram separadas com 2 x 2,5 mL de metanol.

2.4. Medição dos fenólicos

O conteúdo total de fenólicos foi determinado pelo método enzimático (STEVA-NATO, *et al.* 2004). Como alternativa, e para avaliação dos fenólicos obtidos através dos cartuchos SepPack, foi feita uma leitura da absorção a 280 nm. Os valores foram extrapolados para um gráfico de calibração feito com catequinas como modelo e os resultados foram expressos em mg/L de catequina. Os flavonóides totais foram determinados segundo MAKRI *et al.* (2007). Os flavanóis foram determinados depois de uma derivatização com *p*-DMACA (NAGEL e GLORIES, 1991). As procianidinas foram testadas através do método de Harbertson-Adams e modificadas por SKOGERSON, *et al.* (2007). Todas as fracções foram expressas em mg/L de catequina.

2.5. Análise da Actividade Antioxidante

A actividade antioxidante foi estimada seguindo a descoloração do cromóforo ABTS⁺. Os resultados foram expressos em mmols de Trolox/L do mosto ou mmol de Trolox/kg de bagaço de uva.

2.6. Análise estatística

O pacote de software *Statgraphics Plus v. 2* (STSC, Inc., Rockville, MD, E.U.A.) foi utilizado para realizar a análise estatística. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Alterações na concentração de fenóis, índice de escurecimento (IE) e actividade antioxidante total (AAT) determinados nos mostos de uva em diferentes etapas da secagem. Letras diferentes indicam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%.

| Amostra | Fenóis Totais ¹ | Flavonóides ¹ | Flavanóis ¹ | Procianidinas ¹ | IE | AAT ² |
|---------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 0 dias | 130 \pm 16 ^a | 58 \pm 16 ^a | 3.0 \pm 0.3 ^b | 0.30 \pm 0.04 ^a | 0.09 \pm 0.01 ^a | 0.9 \pm 0.1 ^c |
| 3 dias | 239 \pm 34 ^b | 201 \pm 23 ^b | 21 \pm 3 ^b | 10 \pm 1 ^b | 0.40 \pm 0.02 ^b | 2.8 \pm 0.5 ^b |
| 7 dias | 605 \pm 54 ^c | 458 \pm 33 ^c | 55 \pm 4 ^c | 25 \pm 3 ^c | 0.80 \pm 0.04 ^c | 6.5 \pm 0.7 ^a |

¹mg de catequina/L; ²mmols de Trolox/L.

Os fenóis totais (medidos através do método enzimático) e também os flavonóides, os flavanóis e as procianidinas aumentaram bastante as suas concentrações durante o processo de secagem. A elevada concentração de procianidinas observadas nas amostras recolhidas no terceiro e no sétimo dia podem indicar reacções de polimerização durante o processo de secagem. Foi observado um padrão similar para o índice de escurecimento que apresentou os valores mais elevados no final do processo de secagem. Em simultâneo com os fenóis e particularmente os flavonóides está a sua actividade antioxidante (MAKRIS *et al.* 2007). Neste sentido, a amostra recolhida ao sétimo dia mostrou uma actividade antioxidante mais elevada e também uma concentração mais elevada das diferentes fracções fenólicas (Tabela 1).

3.1. Caracterização da actividade antioxidante total nos mostos das uvas.

A absorção a 420 nm monitoriza o escurecimento nos mostos e nos vinhos. Neste sentido, o escurecimento pode dever-se à oxidação enzimática dos ácidos fenólicos e também à formação de compostos com um elevado peso molecular tais como as procianidinas poliméricas e as melanoidinas derivadas da reacção de *Maillard* que são produzidas durante a secagem. Por outro lado, a actividade antioxidante do mosto das uvas secas foi previamente relatada (MORENO *et al.* 2007) e pode dever-se às concentrações fenólicas das uvas e/ou à formação de produtos da reacção de *Maillard* tais como as melanoidinas. Estes foram descritos por vários autores como sendo compostos com actividade antioxidante (TAGLIAZUCCHI *et al.* 2008).

Para distinguir se as alterações no índice de escurecimento e na actividade antioxidante total dos mostos das uvas passas se devem à oxidação das moléculas fenólicas, maioritariamente com um baixo peso molecular (BPM), ou aos compostos com elevado peso molecular tais como as procianidinas poliméricas ou as melanoidinas (EPM), utilizámos as colunas NAP-10.

A figura 1 mostra a evolução durante o processo de secagem pós colheita dos fenóis (figura 1A), o índice de escurecimento (figura 1B) e a actividade antioxidante total (figura 1C) nos mostos das uvas passas e nas moléculas de BPM e EPM. A concentração de fenóis nas fracções de EPM e BPM (figura 2A) aumenta principalmente a partir do quinto e do sétimo dia. No que diz respeito ao índice de escurecimento (figura 2B), foi observado um aumento contínuo durante o processo de secagem para a fracção de EPM.

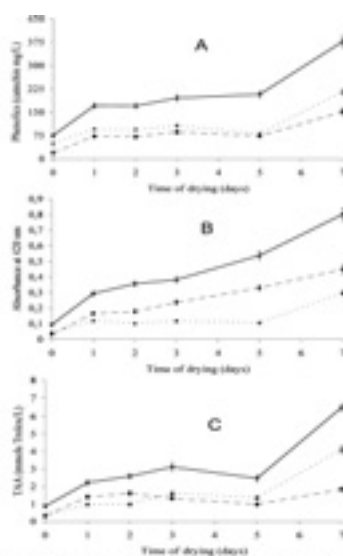


Figura 1.

Fenóis (A), absorção a 420 nm (B) e actividade antioxidante total (C) em mostos (t) e nas fracções de Elevado (h) e Baixo (p) Peso Molecular.

Apenas no final do processo de secagem foi observado um aumento significativo na absorção a 420 nm para a fracção de BPM. Por último, a contribuição das fracções de baixo e elevado peso molecular para a actividade antioxidante total (figura 2C) foi semelhante durante o processo, mas no último dia a fracção de EPM contabilizou apenas um terço da actividade antioxidante total.

3.2. Natureza dos compostos envolvidos na actividade antioxidante

Para além do enriquecimento nas concentrações de fenóis das amostras de mosto durante o processo de secagem, foram encontradas diferenças claras na sua distribuição (figura 2). No início do processo de secagem (dia 0), a maior parte dos fenóis e da actividade antioxidante encontra-se na fracção I (figure 2A). Durante a secagem a concentração de fenóis e também a contribuição das fracções II, III e IV (figura 2B) aumentaram. Finalmente, depois de sete dias (figura 2C) a fracção IV apresentou as concentrações mais elevadas de fenóis e a maior actividade antioxidante.

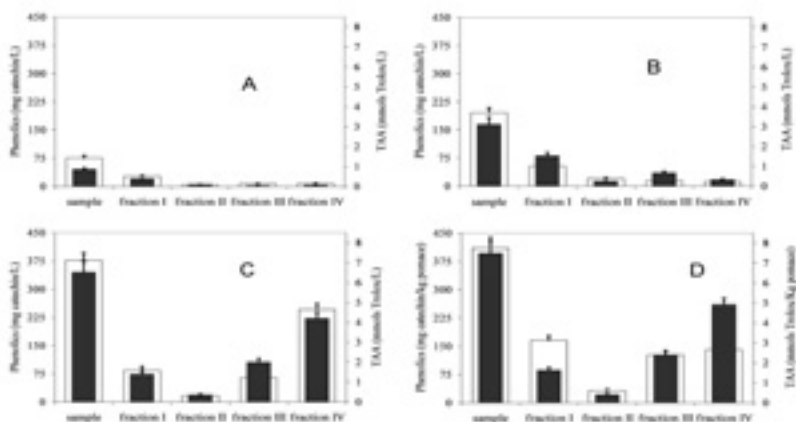


Figura 2. Fracções fenólicas (barras brancas) e actividade antioxidante (barras negras) nos mostos de uvas passas nos dias 0 (A), 3 (B) e 7 (C) e no extracto etanólico do bagaço de uva depois de 7 dias de secagem (D).

3.3. Extracção dos compostos fenólicos da película das uvas passas

A extracção com etanol dos compostos do bagaço de uva foi elaborada para avaliar se o extracto etanólico pode ser adicionado ao mosto em vez de etanol puro. A tabela 2 mostra as concentrações de fenóis totais, flavonóides e flavanóis e a actividade antioxidante total do extracto etanólico do bagaço de uva depois de 0, 3 e 7 dias de secagem. Não foram observadas diferenças significativas nos fenóis totais e na actividade antioxidante nas amostras de bagaço de uva nos dias 0, 3 e 7 de secagem. A extracção relativamente ineficaz com etanol do bagaço de uva pode dever-se à dissecação das películas durante o processo ou a uma menor concentração de água no bagaço de uva à medida que o processo de secagem avança, diminuindo a polaridade do meio de extracção (i.e. o solvente de extracção é mais “não polar”) e, por conseguinte, a extracção de fenóis polares.

Tabela 2. Alterações nas concentrações de fenóis, índice de escurecimento (IE) e actividade antioxidante total (AAT) determinado no extracto etanólico do bagaço de uva em diferentes etapas da secagem. Letras diferentes indicam diferenças relevantes a um nível de confiança de 95%.

| Amostra | Fenóis Totais ¹ | Flavonóides ¹ | Flavanóis ¹ | IE | AAT ² |
|---------|----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| 0 dias | 513±82 ^a | 440±78 ^a | 84±5 ^a | 1.23±0.05 ^a | 10±1 ^a |
| 3 dias | 433±70 ^a | 295±34 ^b | 54±8 ^b | 0.83± 0.04 ^b | 9±1 ^a |
| 7 dias | 410±57 ^a | 258±23 ^b | 67±3 ^c | 0.40±0.2 ^c | 8±1 ^a |

¹mg de catequina/L.; ²mmols de Trolox/kg

A redução observada no índice de escurecimento pode também dever-se à formação de produtos incolores devido à oxidação das catequinas (ES-SAFI, *et al.* 2003).

Relativamente à fracção fenólica dos extractos etanólicos no sétimo dia (figura 2D) pode observar-se que as fracções III e IV são ricas em fenóis e têm uma elevada actividade antioxidante. Além disso, a fracção IV contribui em 72% para a absorção a 420 nm do extracto etanólico ao sétimo dia, ou seja, os fenóis mais polimerizados são provavelmente os principais responsáveis pelo índice de escurecimento (não apresentado).

Resumindo, durante o processo de secagem os mostos de uva são enriquecidos em fenóis aumentando a actividade antioxidante. A distribuição de tais compostos al-

tera-se significativamente realçando a fracção ligada às procianidinas poliméricas. O extracto etanólico pode ser utilizado como fonte de compostos fenólicos para melhorar a qualidade dos vinhos Pedro Ximénez sem aumentar o índice de escurecimento.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por uma concessão do Ministério da Ciência e da Inovação do Governo Espanhol (INIA projecto RTA 2008-00056-CO2), por uma bolsa FPU do Ministério da Educação (anúncio oficial 2008) e tornado possível pela colaboradora Adegas Cooperativas San Acacio (Montemayor (Córdoba), Espanha).

BIBLIOGRAFIA

- Es-Safi, N.-E.; Cheynier V.; and Moutounet M. (2003). Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 153-163.
- Franco, M.; Peinado, R. A.; Medina, M.; and Moreno, J. (2004). Off-Vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3905-3910
- Fuhrman, B.; Volkova, N.; Suraski, A.; and Aviram, M. (2001). White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3164-3168.
- Landraut, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; and Teissedre, P.L. (2001). Antioxidant capacities and phenolic levels on French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3341-3348.
- Makris, D.P.; Boskou, G.; and Andrikopoulos, N.K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.
- Morales, F.J.; and Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119-125.
- Moreno, J.; Peinado, J.; and Peinado, R.A. (2007). Antioxidant activity of musts from Pedro

- Ximénez grapes subjected to off-vine drying process. *Food Chemistry*, 107, 224–228.
- Nagel, C.W., and Glories, Y. (1991). Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 364–366.
- Peinado, R. A.; Moreno, J.; Bueno, J. E.; Moreno, J. A.; and Mauricio J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585-590.
- Re, R.; Pellegrini, A.; Pannala, A.; Yang, M.; and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdiue, D.; Donèche, B.; and Lonvaud, A. (2000). *Handbook of Enology Vol I*. New York: Wiley.
- Skogerson, K.; Downey, M.; Mazza, M; and Boulton, R. (2007). Rapid Determination of Phenolic Components in Red Wines from UV-Visible Spectra and the Method of Partial Least Squares, *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 318-325, ()
- Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; and Conte, A. (2008). Antioxidant properties of traditional balsamic vinegar and boiled must model systems. *European Food Research and Technology*, 227, 835-843.



EFEITO DA BIO-IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS OSMOTOLERANTES NOS ÁLCOOIS SUPERIORES EM VINHOS DOCES PEDRO XIMÉNEZ PARCIALMENTE FERMENTADOS

Teresa GARCÍA-MARTÍNEZ¹; Nieves LÓPEZ DE LERMA²;
Juan MORENO²; Rafael PEINADO²; Juan C. MAURICIO¹

RESUMO

Na Denominação de Origem Montilla-Moriles (Córdoba, Andaluzia, Sul de Espanha), foram produzidos vinhos doces Pedro Ximénez a partir de uvas passificadas ao sol. Foi comparada, no presente estudo, a composição de compostos voláteis e a análise sensorial de vinhos doces Pedro Ximénez obtidos por fermentação de um mosto com 330,27 g/L açúcares (G+F) inoculado separadamente com duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* (X4 y X5) osmo-etanol-tolerantes: a) na forma livre e b) imobilizadas com *Penicillium chrysogenum* H3. Geralmente, as leveduras imobilizadas produzem uma menor quantidade de álcoois superiores em relação às leveduras livres. Os conteúdos de propanol, isobutanol e álcoois isoamílicos foram similares nas fermentações realizadas com as leveduras livres, enquanto o 2-feniletanol apresentou uma concentração mais elevada em vinhos fermentados com a levedura X4.

Palavras-chave: bio-imobilização, vinhos doces, fermentação parcial, álcoois superiores, leveduras osmotolerantes.

1. INTRODUÇÃO

A produção de vinhos doces em Andaluzia é feita com mostos de uvas previamente secas por exposição directa ao sol. Este mosto apresenta uma cor escura, muito densa e viscosa devido à sua elevada concentração de açúcares, superior a 300 g/L. A fermentação destes mostos pode desenvolver-se com dificuldade pela elevada concen-

¹Departamento de Microbiologia. Universidade de Córdoba. Espanha. Tel: 957218640, mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola e Edafología. Espanha. Tel: 957218534, qe1peamr@uco.es

tração de açúcares do mosto CARIDI *et al.* (1999), visto que, tradicionalmente, os vinhos doces foram produzidos alcoolizando directamente os mostos de uvas passificadas ao sol sem fermentar. Para resolver o problema da fermentação de mostos com elevadas concentrações em açúcares foram imobilizadas leveduras osmotolerantes isoladas e seleccionadas destes mostos para produzir vinhos doces naturais.

O nosso grupo de investigação desenvolveu com êxito um sistema de bio-imobilização espontânea entre uma levedura de flor e um fungo filamentoso PEINADO *et al.* (2006). No estudo microscópico observou-se que as células da levedura estavam aprisionadas e aderentes às hifas do fungo, constituindo a parede da biocápsula, aumentando o número de células da levedura à medida que nos aproximamos do centro da biocápsula. A parede desta biocápsula delimita um espaço oco no qual se encontram células livres de levedura. É de salientar que durante a fermentação o fungo filamentoso morre tornando-se um mero suporte inerte para futuras fermentações. O objectivo do presente trabalho foi fermentar parcialmente mostos de uvas passas para reduzir o conteúdo de álcool vínico adicionado aos mesmos. Assim, foi fermentado um mosto de uvas Pedro Ximénez, passificadas ao sol com 330 g/L de açúcares (glucose/frutose equimolar), inoculado com biocápsulas de leveduras osmotolerantes e comparado com a fermentação do mesmo mosto inoculado com células livres das mesmas leveduras imobilizadas. Foram analisados os álcoois superiores, polióis, ésteres e efectuou-se uma análise sensorial dos vinhos obtidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Microrganismos

Foram utilizadas duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* X4 (CECT13014) e X5 (CECT13015) isoladas de mostos fermentados de uvas Pedro Ximénez passificada em Montilla-Moriles e seleccionadas pelas suas características de osmotolerância por GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* (2007). Para os testes de imobilização foi utilizado o fungo filamentoso H3 (*Penicillium chrysogenum*) isolado do ambiente por membros do Departamento de Microbiologia da Universidade de Córdoba e as estirpes de leveduras descritas, obtendo-se, portanto, dois tipos de biocápsulas diferentes.

2.2- Meio de formação de biocápsulas

Como meio de produção de biocápsulas utilizou-se meio YNB (yeast nitrogen base Difco), sem aminoácidos, e como fonte de carbono utilizou-se ácido glucónico (5 g/L). O valor de pH do meio foi ajustado para 7 e, posteriormente, esterilizado em autoclave (120°C, 20 min.). Foi inoculado com 4×10^6 células de levedura/mL e com duas ansas de esporos do fungo filamentososo. As biocápsulas formaram-se por agitação em balões de ensaio Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio num agitador orbital a uma velocidade de agitação de 200 rpm a 28°C durante 7 dias. Nas mesmas condições foram inoculados outros balões de ensaio com 4×10^6 células de leveduras/mL sem fungo filamentososo para as fermentações inoculadas com células livres.

2.3- Mosto e condições de fermentação

Mosto de uvas passas Pedro Ximénez, com 330 ± 22.4 g/L de açúcares redutores e pH inicial de 4.5 ± 0.3 que se corrigiu até atingir um valor de pH de 3,8 mediante a adição de ácido tartárico, foram adicionados 50 mg/L de SO_2 como metabissulfito de potássio, dividido em 10 fracções de 400 mL e colocado em balões de ensaio de 500 mL. Dois balões de ensaio destinaram-se a um controlo sem fermentação, dois outros balões de ensaio foram inoculados com a estirpe X4 na forma livre, dois com a estirpe X4 imobilizada e procedeu-se da mesma forma com a X5. Os balões de ensaio foram cobertos com algodão hidrófobo e mergulhados em água a temperatura regulada a 23 ± 1 °C no qual foram levadas a cabo as fermentações.

Foram feitas fermentações até que o conteúdo em etanol fosse de aproximadamente 8% (v/v). A fermentação foi parada adicionando álcool vínico até atingir uma concentração final de 15% (v/v) e refrigerando os mostos a 2°C. Por último, ao primeiro lote não fermentado também se adicionou o álcool vínico até 15% (v/v). Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.4- Métodos analíticos

As fermentações foram monitorizadas pela quantidade de CO_2 libertado como medida da perda de peso SABLAYROLLES *et al.* (1987); BELY *et al.* (1990). Os compostos voláteis maioritários foram determinados mediante cromatografia de gases segundo o método proposto por PEINADO *et al.* (2004).

2.5 – Análise estatística

Os voláteis maioritários determinados na fermentação de controlo, com células livres e imobilizadas foram submetidas a uma análise de variância para determinar se existem diferenças significativas nas concentrações destes compostos. Para isto, utilizou-se o programa estatístico Statgraphics Plus v. 2 (STSC, Inc., Rockville, MD).

3- RESULTADOS E CONCLUSÕES

É do conhecimento geral que o propanol, o isobutanol, os álcoois isoamílicos e o 2-feniletanol são compostos voláteis que contribuem para a complexidade aromática do vinho e são produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica através de ceo-tóácidos em concentrações que oscilam entre os 20 e os 300 mg/L. Em geral, produziu-se uma diminuição dos conteúdos em álcoois isoamílicos e isobutanol com as estirpes imobilizadas. No entanto, o 2-feniletanol apresentou uma concentração mais elevada em vinhos fermentados com a levedura X4 na sua forma livre (Fig. 1). Em relação à concentração de metanol observou-se uma maior concentração nos vinhos obtidos após a fermentação com leveduras na forma livre e imobilizada, em nenhum dos casos os conteúdos são anormalmente elevados. Não obstante, dado que este composto não segue a via habitual de formação do resto dos álcoois, a não ser que se produza pela hidrólise das pectinas presentes no engaço, é muito provável que as leveduras seleccionadas apresentem uma certa actividade pectinase.

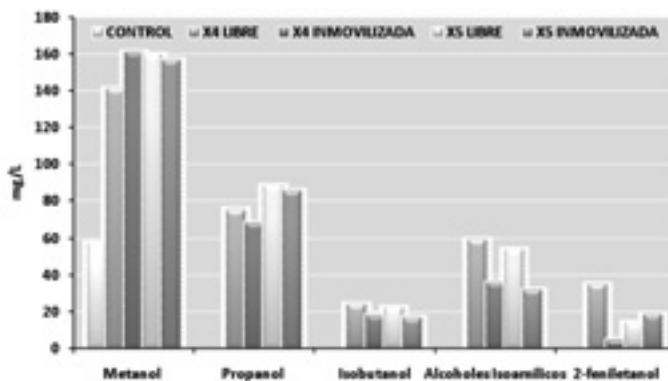


Figura 1. Concentração (mg/L) dos álcoois maioritários quantificados.

A acetoína é um produto secundário produzido nas primeiras fases da fermentação alcoólica. As concentrações alcançadas nos vinhos obtidos após a fermentação parcial são ligeiramente elevadas, se as compararmos com os vinhos secos produzidos a partir da mesma variedade de uva, os quais oscilam entre os 16 e os 80 mg/L (MUÑOZ *et al.* 2005). Destaca-se a produção de acetoína pela levedura X5 na sua forma livre (Fig. 2).

Destacam-se igualmente outros compostos derivados da fermentação glicero-pirúvica como a glicerina nos vinhos obtidos após a fermentação parcial. Estas concentrações são similares às que se encontram em outros mostos doces como os de podridão nobre (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2002), não obstante, dado que as uvas estavam em perfeito estado sanitário durante o processo de passificação a concentração pode dever-se ao processo de desidratação. Quanto aos mostos fermentados, estes apresentam uma concentração anormalmente elevada, acima dos 15 g/L, o que se deve, possivelmente, ao stress osmótico das leveduras causado pela elevada concentração de açúcares (MALACRINO *et al.* 2005). Também se destacam as concentrações em 2,3-butanodiol *cis* e *trans* dos mostos fermentados (Fig. 2).

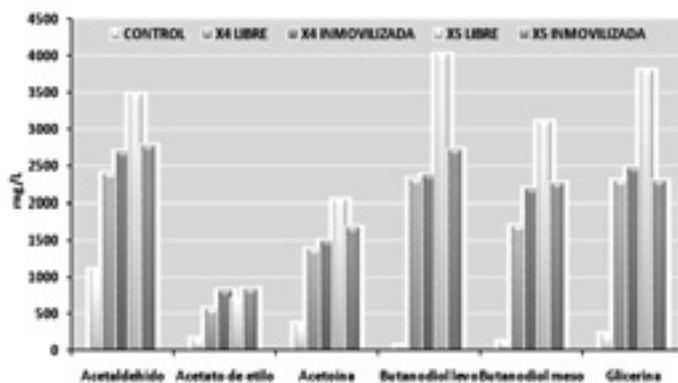


Figura 2. Concentração (mg/L) dos produtos da fermentação glicero-pirúvica quantificados. (Concentrações de acetaldeído, acetato de etilo e acetoína x 10; Concentração de glicerina x 100 e em mg/L).

Por último, é de salientar a concentração em acetato de etilo dos mostos fermentados em relação à testemunha sem fermentação. Esta concentração sugere uma elevada produção de ácido acético pelas leveduras durante a fermentação. Neste sentido, CARIDI

et al. (1999) relacionou a produção de ácido acético pelas leveduras com o stress osmótico que estas sofrem em meios com uma concentração elevada de açúcar. Embora nos vinhos secos esta concentração possa supor um detrimento na qualidade organoléptica dos vinhos, observou-se recentemente que não tem influência no caso dos vinhos doces LOPEZ DE LERMA (2009).

4-ANÁLISE ORGANOLÉPTICA

Com o objectivo de determinar o efeito da fermentação nas características organolépticas dos mostos, as amostras foram submetidas a uma análise sensorial. Esta análise consistiu em avaliar o aroma e o sabor dos vinhos mediante a utilização de uma escala ordinal, formada por três graus de qualidade: indesejável, aceitável e desejável.

O primeiro ensaio realizado para classificar os vinhos consistiu na avaliação do aroma. As distribuições de frequências (Fig. 3) mostram que todas as amostras apresentam uma qualificação média aceitável. Não obstante, tanto a testemunha como a amostra obtida após a fermentação parcial realizada com a levedura X5 na forma livre apresentam 33% de respostas cuja qualificação é indesejável. Também se destaca o aumento de respostas com valorização desejável quando se comparam os vinhos obtidos com leveduras livres relativamente aos vinhos obtidos com leveduras imobilizadas.

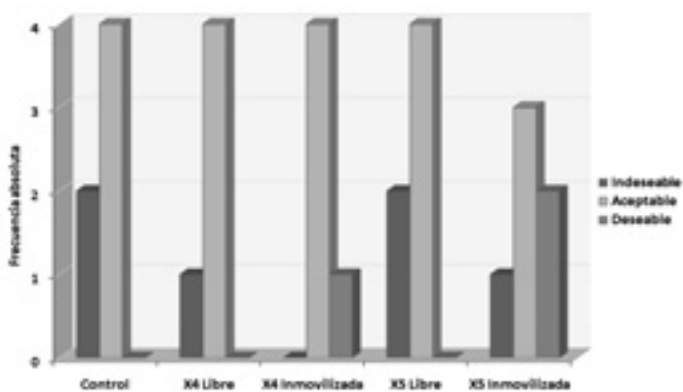


Figura 3. Distribuição de frequências absolutas resultantes da valorização do aroma pelo painel de degustação.

O segundo ensaio realizado para classificar os vinhos consistiu na avaliação do gosto (Fig. 4). A tendência mostrada é muito similar à observada no caso do aroma, embora no caso da testemunha se tenha obtido igualdade relativamente às respostas com classificação indesejável e aceitável. Neste caso, os vinhos obtidos com leveduras imobilizadas tiveram melhor classificação que os obtidos com células livres.

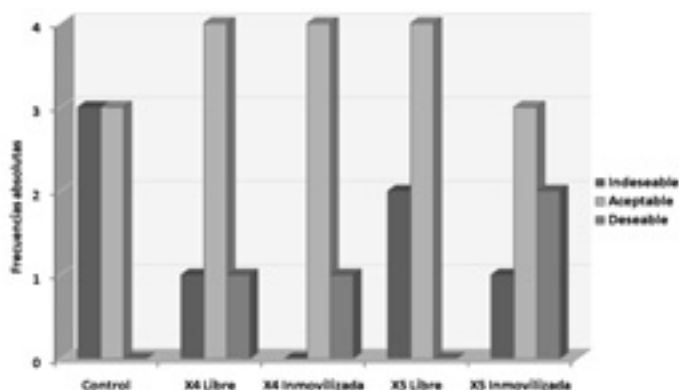


Figura 4. Distribuição de frequências absolutas resultantes da classificação do gosto pelo painel de degustação.

Estes resultados podem ser explicados com base na complexidade aromática mais elevada dos vinhos fermentados, na qual aparecem aromas secundários, mas conservam parte dos aromas primários provenientes da variedade Pedro Ximénez. Além disso, devido ao maior valor de acidez das amostras fermentadas existe um melhor equilíbrio acidez - doçura. Um desequilíbrio destas características organolépticas inclinado/ com tendência para o adocicado faz com que os vinhos doces de uva seca elaborados de forma tradicional possam ser considerados em algumas ocasiões como demasiado estruturados.

5- CONCLUSÕES

Em resumo, é possível afirmar que os vinhos doces obtidos após a fermentação parcial dos mostos de uvas passificadas apresentam uma complexidade aromática mais elevada e um melhor equilíbrio doçura - acidez. Entre as leveduras seleccionadas a que apresentou uma maior aceitação foi a levedura X4 e, em geral, os vinhos obtidos com leveduras imobilizadas obtiveram melhor classificação do que os obtidos com leveduras livres. Quanto aos voláteis maioritários e polióis destaca-se uma concentração mais elevada em glicerina, o que sem dúvida contribuirá para uma maior untuosidade dos vinhos assim obtidos em relação aos produzidos de forma tradicional.

AGRADECIMENTOS:

Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Inovação (INIA) projecto RTA2008-00056-C02-02 e FEDER, e foi possível graças a uma bolsa FPU concedida pelo Ministério da Educação (convocatória 2008).

BIBLIOGRAFIA

- BELY M; SABLAYROLLES J.M.; BARRE P. 1990. **Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions.** *J Ferment Bioeng*, 70: 246-252.
- CARIDI A; CRUCITTI P; RAMONDINO D. 1999. **Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast.** *Biotechnol. Lett.* 21, 617-620.
- GARCÍA-MARTÍNEZ T; MAESTRE O; PEINADO RA; MORENO J; MAURICIO JC. 2007. **Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares.** *Gienol 2007. Badajoz.*
- LOPEZ DE LERMA N. (2009). **Vinos dulces obtenidos por fermentación parcial de mostos de uvas Tempranillo pasificadas.** Tesis de Licenciatura. Córdoba
- MALACRINO P; TOSI E; CARAMIA G; PRISCO R; ZAPPAROLI G. 2005. **The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress.** *Lett Appl. Microbiol.* 40: 466-472.

- MUÑOZ D; PEINADO RA; MEDINA M; MORENO J. 2005. **Biological aging of sherry wines using pure cultures of two flor yeast strains under controlled microaeration.** *J. Agric. Food Chem*, 53: 5258-5264.
- PEINADO RA; MORENO JA; MUÑOZ D; MEDINA M; MORENO JJ. 2004. **Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection.** *J Agric Food Chem*, 52: 6389-6393.
- PEINADO RA; Moreno JJ; Villalba JM; González-Reyes JA; Ortega JM; Mauricio JC. 2006. **Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications.** *Enz. Microb. Technol.* 40: 79-84.
- RIBEREAU-GAYON P; GLORIES Y; MAUJEAN A; DUBOURDIEU, D. 2002. **Tratado de enología 2. Química del vino. Estabilización y tratamientos.** Ed. MP. Buenos Aires.
- SABLAYROLLES JM; BARRE P; GRENIER P. 1987. **Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions.** *Biotechnol Tech*, 1: 181-184.



TEORES DE METANOL EM AGUARDENTES VÍNICAS E BAGACEIRAS PORTUGUESAS

Deolinda MOTA¹; Ana C. P. M. das Neves LUÍS²; Otilia CERVEIRA¹; Ofélia ANJOS^{2,3}; Sara CANAS¹; Ilda CALDEIRA^{1*}

RESUMO

O metanol é um álcool resultante da degradação das pectinas que ocorre durante o processo de fermentação do vinho e do bagaço, passando para a aguardente durante o processo de destilação. A tecnologia utilizada na preparação dos vinhos e dos bagaços condiciona o seu teor nos destilados. Por razões de toxicidade, o teor de metanol nas aguardentes é limitado a 1000g/hL de álcool puro nas aguardentes bagaceiras e 200g/hL nas aguardentes vínicas (Reg. CE. 110/2008). Assim, antes da colocação das aguardentes no mercado deve ser avaliado o teor deste álcool, o qual é normalmente quantificado por cromatografia-gás-líquido de alta resolução.

Neste trabalho são apresentados os teores de metanol de um número considerável de amostras analisadas no nosso laboratório, em 2007, 2008 e 2009. Os resultados obtidos mostram que nenhuma das amostras de aguardente vínica analisada apresentou um teor superior ao limite legal estabelecido. No caso das aguardentes bagaceiras, apenas quatro das amostras analisadas apresentaram teores acima do limite legal.

Palavras-chave: metanol, quantificação, aguardente vínica, aguardente bagaceira

1. INTRODUÇÃO

As aguardentes vínicas e as aguardentes bagaceiras são obtidas, respectivamente, a partir da destilação de vinhos e de bagaços previamente fermentados (Reg. CE. 110/2008). Após o processo de destilação, o destilado obtido terá que obrigatoriamente envelhecer em vasilhas de madeira, no caso das aguardentes vínicas, enquanto as aguar-

¹ INIA-Dois Portos/INRB, Quinta da Almoíña - 2565-191 Dois Portos, Portugal.

Tel.: +351261712106; Fax: +351261712426; e-mail: evn.icaldeira@mail.net4b.pt ou ilda.icaldeira@inrb.pt

² Unidade Departamental de Silvicultura e Recursos Naturais, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Apartado 119, 6000 Castelo Branco, Portugal.

³ CERNAS – Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade, Bencanta, 3040-316, Coimbra, Portugal

* Autor para correspondência

dentes bagaceiras poderão ser comercializadas sem sofrer qualquer processo de envelhecimento.

Para além do etanol, já foram identificados em ambos os destilados centenas de compostos voláteis (CALDEIRA, 2004; CORTÉS *et al.*, 2005). A composição volátil das aguardentes vínicas é influenciada por vários factores, nomeadamente a qualidade da uva (MAZEROLLES *et al.*, 1992), a tecnologia de vinificação (RIPONI *et al.*, 1992) e a tecnologia de destilação (BELCHIOR e CURVELO-GARCIA, 1971; CARVALHO e BELCHIOR, 1983).

De modo similar, a composição volátil das aguardentes bagaceiras é condicionada por diversos factores, designadamente a tecnologia de vinificação (BELCHIOR e CARVALHO, 1978), as condições de conservação dos bagaços (BELCHIOR, 1977; BELCHIOR e CARVALHO, 1980; SILVA e MALCATA, 1999; CORTÉS-DIÉGUEZ *et al.*, 2001) e a tecnologia de destilação (BELCHIOR e CARVALHO 1977).

O metanol é um dos compostos voláteis, que tem merecido particular atenção devido à sua toxicidade. De facto, trata-se de uma substância neurotóxica para o ser humano, afectando especialmente a retina, tendo sido detectadas várias situações de intoxicação por metanol, associado ao consumo de bebidas alcoólicas adulteradas e com teores elevados deste álcool (PAINE e DAVAN, 2001)

A presença de metanol nas aguardentes vínicas e bagaceiras resulta das desmetilação das pectinas da uva, por acção da enzima pectinametilesterase, que ocorre naturalmente durante a maturação das uvas e no processo de fermentação das uvas e dos bagaços. Como as pectinas existem em maior quantidade nas películas da uva, o teor de metanol é normalmente mais elevado nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos e, no caso dos destilados, o seu teor é bastante mais elevado nas aguardentes bagaceiras do que nas aguardentes vínicas. Assim, encontram-se definidos limites legais para os teores de metanol nas aguardentes, sendo de 1000g/hL de álcool puro nas aguardentes bagaceiras e 200g/hL nas aguardentes vínicas (Reg. CE.110/2008).

O controlo do teor de metanol é, por isso, fundamental antes da colocação das aguardentes no mercado.

O objectivo deste trabalho é apresentar os teores de metanol de um número considerável de amostras de aguardentes que foram analisadas no laboratório do INIA - Dois Portos em 2007, 2008 e 2009.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Aguardentes

Foram analisadas 38 amostras de aguardentes vínicas (com e sem envelhecimento em madeira) e 49 amostras de aguardentes bagaceiras (com e sem envelhecimento).

Obtenção do destilado e determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico foi determinado por destilação e densimetria electrónica (OIV, 2009). Os resultados são arredondados às décimas e resultam da média aritmética das três leituras.

Quantificação do metanol por cromatografia gás-líquido de alta resolução

A quantificação de metanol foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução, de acordo com a NP 3263 (CT 83, 1990).

Nas aguardentes envelhecidas em madeira o metanol foi determinado no destilado previamente obtido, conforme 2.2. Nas aguardentes sem envelhecimento em madeira o metanol foi quantificado por análise cromatográfica directa das aguardentes.

Condições cromatográficas: cromatógrafo Focus GC (Thermo Scientific, EUA) equipado com um detector de ionização de chama DIC (250°C), injector (200°C) a funcionar em modo de divisão e com uma coluna capilar de sílica de polietileno glicol (DB-WAX da J & W Scientific, Folsom, CA, EUA), 60m x 0,32 mm x 0,25 µm). O gás de arraste foi o hidrogénio (3,40 mL/min) e a razão de divisão foi de 1:6. O programa de gradiente térmico foi o seguinte: 35°C (8 minutos em isotérmica), 10°C/min até 200°C (9 minutos). O volume de amostra injectado foi aproximadamente de 1,0 µL

Preparação da amostra para injectar: 10 mL de aguardente ou de destilado foram adicionados de 1mL de padrão interno (5-metil-2-pentanol)

Calibração: 10 mL de uma solução hidroalcoólica de metanol a 50% foram adicionados de 1mL de padrão interno e injectados nas mesmas condições das amostras analisadas, de acordo com a NP 3263 (CT 83, 1990). Na Figura 1 apresentam-se cromatogramas de uma aguardente vínica envelhecida, de uma aguardente bagaceira sem envelhecimento e de uma solução hidroalcoólica (50% v/v) de padrões.

Os resultados serão apresentados em gramas por hectolitro de álcool puro.

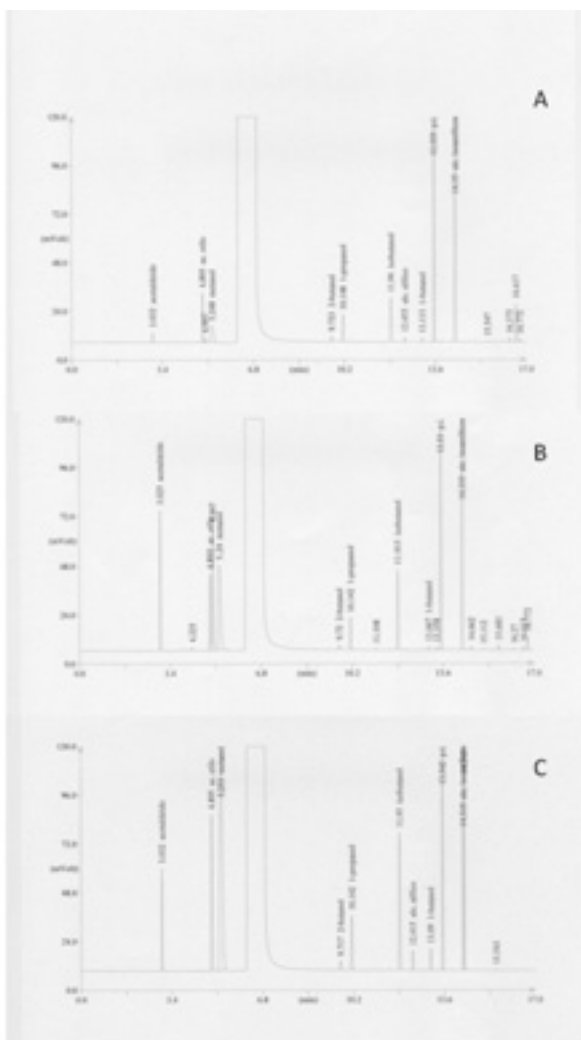


Figura 1- Cromatogramas de uma aguardente vínica envelhecida (A), de uma aguardente bagaceira (B) e de uma solução hidroalcoólica (50%) de padrões (C). Identificação dos compostos: etanal (acetaldeído); acetato de etilo; metanol; 2-butanol; 1-propanol; 2-metil-1-propanol (isobutanol); 2-propeno-1-ol (álcool alílico); 1-butanol; 2+3-Metil-1-Butanol (isoamilicos); padrão interno (p.i.); 5-metil-2-hexanol.

3. RESULTADOS

Os resultados médios do teor de metanol das aguardentes bagaceiras e vnicas são apresentados na Figura 2.

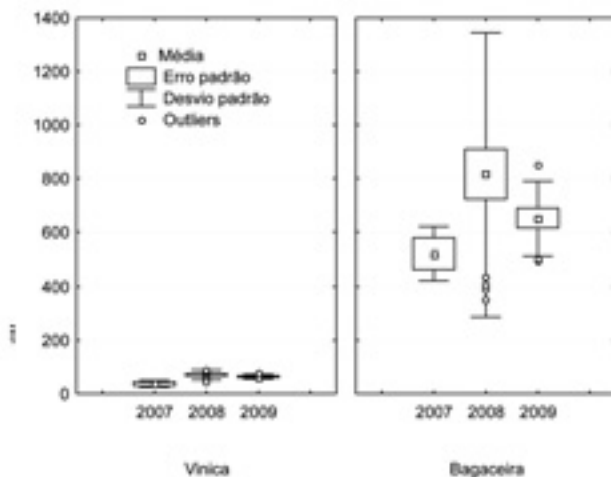


Figura 2 – Teores médios de metanol nos dois tipos de aguardente de origem vnicica

O valor médio do teor de metanol para as aguardentes vnicas foi de 66,9 g/hL A.P. Este valor é equivalente aos determinados por outros autores em aguardentes de Cognac (PUECH *et al.*, 1984) e é ligeiramente superior aos valores apresentados noutros trabalhos (CANTAGREL *et al.*, 1991; JURADO *et al.*, 2008).

No entanto, todos os valores se encontram abaixo do limite legal de 200g/hL A.P., sendo de notar que 97% das amostras apresentam valores abaixo dos 100g/hL. (Figura 3).

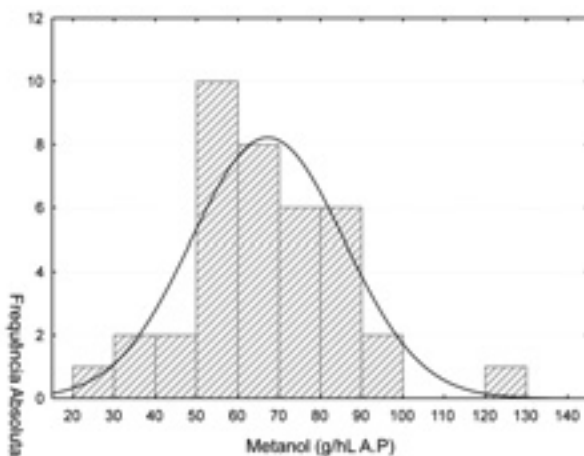


Figura 3 – Histograma dos teores de metanol determinados nas aguardentes víquicas.

O valor médio das aguardentes bagaceiras foi de 751 g/hL A.P. (Figura 2). Valores semelhantes foram determinados em amostras comerciais de “Orujo de Galicia” (ORRIOLS *et al.*, 2008) e de aguardentes da Região dos Vinhos Verdes (PINTADO *et al.*, 1999).

No caso das aguardentes bagaceiras, 92% das amostras analisadas apresentaram teores de metanol abaixo do limite legal actualmente estabelecido (1000g/hL A.P.) e 8% das amostras apresentaram valores muito acima desse limite (Figura 4). Estes valores, acima do limite, resultarão provavelmente de uma má tecnologia na obtenção das respectivas aguardentes, designadamente de condições de ensilagem menos adequadas e/ou de um prolongado tempo de ensilagem dos bagaços, que se sabe contribuírem de forma decisiva para um elevado teor de metanol (BELCHIOR, 1977; BELCHIOR e CARVALHO, 1980; SILVA e MALCATA, 1999; CORTÉS-DIÉGUEZ *et al.*, 2001). No entanto, como se pode observar pelo histograma, são valores que aparecem como aberrantes, não representando a situação mais frequente.

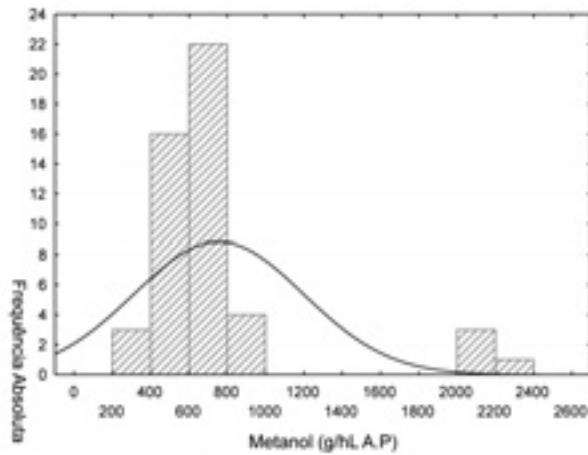


Figura 4 – Histograma dos teores de metanol determinados nas aguardentes bagaceiras

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que a tecnologia actualmente disponível permite a obtenção de aguardentes vónicas e bagaceiras com teores de metanol abaixo dos limites legalmente estabelecidos, consequência de uma crescente preocupação, por parte não só dos produtores como das entidades responsáveis, por garantir a qualidade destes produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELCHIOR A.P. 1977 Qualidade e composição química das aguardentes de bagaço. I- Influência dos tempos de ensilagem dos bagaços. *De Vinea et Vino Portugalia Documenta - Serie II* 7(4) 1-8.
- BELCHIOR A.P., CARVALHO E. 1977 Qualidade e composição química das aguardentes de bagaço. I- Influência dos alambiques “Déroy” e “Caldeira Bagaceira” *De Vinea et Vino Portugalia Documenta - Serie II* 7(4) 9-15.
- BELCHIOR A.P., CARVALHO E. 1978 Implicações da termovinificação nos teores em metanol e nas fermentações dos bagaços. *De Vinea et Vino Portugalia Documenta - Serie II* 8(3) 1-14.
- BELCHIOR A.P., CARVALHO E. 1980 Factores que condicionam os teores de metanol nos bagaços *De Vinea et Vino Portugalia Documenta - Serie II* 10(2) 1-9.
- BELCHIOR A.P., CURVELO GARCIA A.S., 1971. Comportamento de alguns constituintes voláteis das aguardentes tipo “Cognac” no decurso da destilação. *Vin. Port. Doc.*, 6, 1-14.
- CALDEIRA I. 2004_ *O aroma de aguardentes vnicas envelhecidas em madeira. Importância da tecnologia de tanoaria* 238.p. Dissertação para obtenção do grau de doutor em Engenharia Agro-Industrial, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- CANTAGREL R., MAZEROLLES G., VIDAL J.P., LABLANQUIE O., BOULESTEIX J.M 1991 L’assemblage: une etape importante dans le processus d ’elaboration des Cognacs. *In: Les eaux-de-vie traditionnelles d’origine viticole* 243-253 Bertrand A. (ed.), Lavoisier - Tec & Doc, Paris.
- CARVALHO E.C., BELCHIOR A.P., 1983. Influência do aquecimento do Alambique “Charentais” no rendimento e qualidade da aguardente. *Ciência Téc. Vitiv.*, 2, 67-72.
- CORTÉS DIÉGUEZ S., GIL DE LA PEÑA M.L. FERNÁNDEZ GÓMEZ E. 2001 Concentration of volatiles in marc distillates from galicia according to storage conditions of the grape pomace *Chromatographia* 53 S406-S409
- CORTES S., GIL M.L., FERNANDEZ E. 2005 Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits *Food Control* 16 383–388.
- CT83, 1990. NP3263, Bebidas alcoólicas e espirituosas - determinação dos teores de etanal, acetato de etilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-propeno-1-ol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol+3-metil-1-butanol. IQA, Lisboa.
- JURADO M. SOLEDAD., PUERTAS B., CANTOS E. GUILLEN D.A. 2008 Influence de l’anhy-

- dride sulfureux et de la lie sur la qualité du Brandy distillé à la Chaudière. *In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole* 79-87, Bertrand A. (ed.), Lavoisier - Tec & Doc, Paris.
- MAZEROLLES G., VIDAL J.P., LABLANQUIE O., CANTAGREL R., 1992. Caractérisation analytique des eaux-de-vie nouvelles provenant de récoltes différentes. *In: Élaboration et connaissance des spiritueux*. 428-431. Cantagrel R. (ed.), TEC & DOC-Lavoisier, Cognac.
- OIV, 2009 Actualisation du recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole de l'OIV - partie 1-Résolution OIV/OENO 379/2009, Paris.
- ORRIOLS I., CORTÉS S.M., FORNOS D. 2008 Caractéristiques des distillats de marc du commerce "Orujo de Galicia" d'Espagne. *In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole* 173-177. Bertrand A. (ed.), Lavoisier - Tec & Doc, Paris.
- PAINE A, DAVAN A D.** 2001 Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. **Hum Exp Toxicol.** 20(11):563-8.
- PINTADO A. I. E., COSTA M. L. S., CASTRO T. M. C. A. S., TRIGUEIROS J. J. B. L., XAVIER MALCATA F. 1999 Bagaceira de Vinho Verde Branco: Caracterização do Processo Tradicional de Produção e Melhoramento Tecnológico, Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia.
- PUECH J.-L., LEAUTÉ R., CLOT G., NOMDEDEU L., MONDIÉS H., 1984. Évolution de divers constituants volatils et phénoliques des eaux-de-vie de cognac au cours de leur vieillissement. *Sci. Aliments*, **4**, 65-80.
- RIPONI C., ANTONELLI A., CARNACINI A., MOTTA M., 1992. Aptitudes de certaines souches de levures à l'élaboration de vins pour la production d'eaux de vie. *In: Elaboration et connaissance des spiritueux*. 161-171. Cantagrel R. (ed.), TEC & DOC-Lavoisier, Cognac.
- SILVA M.L., MALCATA F. X. 1999 Effects of time of grape pomace fermentation the chemical composition of grape marcs *Z Lebensm Unters Forsch A* (1999) 208 :134-143.



OS FENOIS VOLÁTEIS E OS SEUS PRECURSORES EM SOLUÇÕES MODELO E EM VINHO

Maria João CABRITA¹; Raquel PATÃO²; Ana Maria COSTA FREITAS¹

RESUMO

A produção de fenóis voláteis tem causado grande preocupação na indústria vitivinícola por ser responsável pela introdução de aromas desagradáveis que afectam a qualidade dos vinhos. Os etilfenóis, resultantes da degradação dos ácidos hidroxicinâmicos devido à actividade microbiana, conferem aos vinhos um aroma a estrebaria quando presentes em concentrações elevadas.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência das leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* na degradação dos ácidos hidroxicinâmicos, tentando correlacioná-la com a taxa de formação dos etilfenóis.

A composição de ácidos fenólicos e de fenóis voláteis num meio sintético e em vinhos tintos inoculados com leveduras deste género foi determinada por HPLC-DAD e GC-FID, respectivamente. Através destes métodos analíticos foi possível identificar e quantificar os ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico e os etilfenóis 4-etilcatecol, 4-etilfenol e 4-etilguaiaacol ao longo do tempo. Os resultados obtidos permitiram concluir que as leveduras *D. bruxellensis* podem ser consideradas leveduras contaminantes muito importantes, dada a sua capacidade de produzirem quantidades elevadas de etilfenóis que são responsáveis pela deterioração do vinho.

PALAVRAS CHAVE: fenóis voláteis, 4-etilcatecol

1 - INTRODUÇÃO

A presença de fenóis voláteis em vinhos tintos pode ser uma preocupação para a indústria vitivinícola, sendo considerada actualmente um ponto fundamental do controlo de qualidade dos vinhos. Os fenóis voláteis, vinil-fenois e etil-fenois, podem ser produ-

¹ Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Ap 94 7002-554 Évora, Portugal. Email: mjbc@uevora.pt; afreitas@uevora.pt

² Aluna do Mestrado de Engenharia Química e Química Aplicada da Universidade Técnica de Lisboa

zidos através da actividade microbiológica, de forma sequencial, dando origem a aromas estranhos, facilmente identificáveis em vinhos. A qualidade dos vinhos pode ser afectada pela presença de 4-etilfenol e 4-etilguaicol, os dois principais fenóis voláteis, cuja presença origina aromas descritos como estrebaria, suor a cavalo e medicinal.

Embora a origem dos fenóis voláteis em vinhos tenha estado em discussão durante muito tempo, parece hoje indiscutível que a sua origem está relacionada com a degradação dos ácidos hidroxicinâmicos e dos seus correspondentes ésteres, por acção de leveduras de contaminação do género *Brettanomyces/Dekkeras* (LOUREIRO *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos descrevem a presença de 4-etilfenol e 4-etilguaicol em vinhos (PIZARRO *et al.*, 2007; VALENTÃO *et al.*, 2007), mas a presença do 4-etilcatecol havia sido referida apenas uma vez (HESFORD *et al.*, 2004) até que CARRILLO e TENA (2007) demonstraram a sua presença em vinhos contaminados com leveduras do género *Brettanomyces/Dekkeras*.

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar a transformação dos ácidos hidroxicinâmicos e a conseqüente formação de fenóis voláteis, por uma levedura do género *Brettanomyces/Dekkeras*, em meio sintético e em vinho, com particular ênfase para o 4-etilcatecol, utilizando métodos de preparação de amostra muito simples, baseados em extracções líquido-líquido.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

2.1.1. Meio sintético

As estirpes de leveduras *Dekkera bruxellensis* 1791 cedidas pelo ISA (Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal) foram isoladas de um vinho tinto contaminado e mantidas num meio GYPC [50 g/L de glucose (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3 g/L de extracto de leveduras (Difco Laboratories, Detroit, USA), 5 g/L de peptona e 20 g/L de agar a pH 6,0 e 5 g/L de carbonato de cálcio (Merck)] a 4 °C.

Para o crescimento das leveduras, foi utilizado um meio sintético [6,7 g/L YNB (Difco)] adicionado de 2% de glucose (p/v) e 10% (v/v) de etanol a 99,8%, com pH final de 5,5.

O meio sintético foi filtrado (através de membranas esterilizadas de 0,22 µm) e agitado a 120 rpm a 25 °C. A concentração de biomassa foi medida diariamente através

da densidade óptica a 640 nm. Quando a biomassa atingiu o valor $DO_{640\text{ nm}} = 1$, o meio foi dividido em 9 frascos de vidro de 500 ml (amostras B1 a B9) de modo a obter uma concentração de 10^4 células/ml em cada um. Às amostras B1, B2 e B3 adicionaram-se 5 mg de ácido cafeico, às amostras B4, B5 e B6 foram adicionadas 5 mg de ácido *p*-cumárico e às amostras B7, B8 e B9 adicionaram-se 5 mg de ácido ferúlico. Todas as amostras foram mantidas na estufa a 23 °C durante 8 dias. As mesmas amostras foram analisadas simultaneamente, de 2 em 2 dias, por HPLC-DAD e GC-FID para determinação da evolução da concentração dos ácidos fenólicos e dos etilfenóis, respectivamente.

2.1.2. Vinho

Um vinho tinto de 2007 ainda sem a fermentação maloláctica realizada, foi dividido em duas partes: uma parte C que funcionou como controlo, e uma parte Y que se inoculou com a levedura *Dekkera bruxellensis* 1791. A metade de C e a metade de Y adicionaram-se 15 mg/L de cada um dos três ácidos fenólicos (C+A e Y+A). Os vinhos foram mantidos a 25°C e colheram-se amostras após um e dois meses. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2 – Análise por HPLC

2.2.1. Preparação das amostras

Amostras de 5 mL, com pH ajustado a 2, foram extraídas em duplicado com 5 mL de éter etílico durante 10 minutos, com agitação. Após cada extracção, as amostras foram decantadas e as fracções orgânicas combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas à secura num fluxo suave de azoto. O resíduo obtido foi redissolvido em 1 mL de solução metanol/água (1:1) e filtrado através de um filtro de 0,45 µm antes de serem analisados por HPLC-DAD.

2.2.2. Condições cromatográficas

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida da Hewlett Packard série 1050 equipado com um loop de 20 µl, uma bomba quaternária e um detector de fotódiodos (DAD) da HP série 1100.

A coluna utilizada para a separação dos compostos fenólicos foi uma RP Superher® 100, C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm) (Merck, Alemanha) com précoluna do

mesmo material. Os eluentes utilizados foram: solvente A - água/ácido acético (98:2 v/v) e solvente B água/metanol/ácido acético (68:30:2 v/v), com um fluxo de 1 mL/min, de acordo com o seguinte gradiente para o solvente A: de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocrático durante 9 minutos; de 23% a 5% (5 min); de 5% a 0% (3 min); isocrático durante 5 minutos. A detecção dos compostos foi feita a 320 nm.

2.2.3. Rectas de calibração

Tabela 1 – Parâmetros de calibração para os ácidos fenólicos

| Composto | TR± DP (minutos) | Equação | r ² |
|--------------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| Ácido cafeico | 27,20±0,98 | Y=391,03 X -167,74 | 0,9993 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 37,68±1,05 | Y = 521,08 X -107,10 | 0,9999 |
| Ácido ferulico | 43,94±1,40 | Y = 421,86 X - 276,27 | 0,9986 |

TR ± DP tempo de retenção ± desvio padrão (n=3); r² coeficiente de correlação.

As rectas de calibração foram obtidas por injeções em triplicado de seis soluções padrão com diferentes concentrações (tabela 1) preparadas a partir de uma solução mãe contendo ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferulico em etanol a 12% (v/v).

2.3 – Análises por GC-FID

2.3.1. Preparação das amostras

Adicionaram-se 200 µL de uma solução de 800 mg/L de 3,4-dimetilfenol (padrão interno) a amostras de 10 mL. Cada amostra foi extraída em duplicado com 5 mL de solução éter dietílico/pentano (1:1) durante 10 minutos, com agitação. Após cada extracção as amostras foram decantadas e as fracções orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas até ao volume de 0,5 mL sob fluxo suave de azoto. O resíduo obtido foi analisado por GC-FID.

2.3.2. Condições cromatográficas

Na cromatografia em fase gasosa utilizou-se um cromatógrafo da Hewlett Packard série 6890 com as seguintes características: coluna RTX-Wax da Resteck (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), injetor no modo splitless a 230 °C e detector de ionização de chama (FID) a 250 °C. Usou-se hélio como gás de arraste com um fluxo de 1,4 mL/min. O forno estava a 80°C, aumentando até 140°C a 10°C/min, até 155°C a 5°C/min, até 200°C a 10°C/min (2 minutos) e finalmente até 220°C a 20°C/min.

2.3.3. Rectas de calibração

O padrão interno foi preparado em etanol a 75% (v/v). Foi preparada uma solução mãe contendo 80 mg/L de 4-etilcatecol, 80 mg/L de 4-etilguaiaicol e 50 mg/L de 4-etilfenol em etanol a 75%. Soluções de trabalho foram obtidas diluindo a solução mãe com uma solução modelo (4 g/L ácido tartárico; 3 g/L ácido málico; 0,1 g/L ácido acético; 0,025 g/L sulfato de magnésio; 0,1 g/L sulfato de potássio e 90 g/L etanol; pH = 3,30). Cada solução padrão foi extraída e injectada três vezes. Os parâmetros de calibração encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de calibração dos fenóis voláteis

| Composto | TR± DP (minutos) | Equação | r ² |
|-----------------|------------------|------------------|----------------|
| 4-etilguaiaicol | 6,68±0,01 | Y=0,0504x+0,0054 | 0,9993 |
| 4-etilfenol | 8,01±0,01 | Y=0,0611x-0,0083 | 0,9999 |
| 4-etilcatecol | 14,67±0,05 | Y=0,0376x-0,0004 | 0,9993 |

TR ± DP tempo de retenção ± desvio padrão (n=3); r² coeficiente de correlação.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1, 2 e 3 apresentam a evolução das concentrações dos ácidos fenólicos e dos etilfenóis ao longo do tempo, após a inoculação de leveduras *Dekkera bruxellensis*. Os resultados obtidos mostram que a diminuição da concentração dos ácidos fenólicos é acompanhada por um aumento da concentração dos fenóis voláteis.

Tanto o 4-etilfenol como o 4-etilguaicol foram detectados em todas as amostras analisadas a partir do 2º dia após a inoculação das leveduras. As suas concentrações atingiram os 7,69 e os 7,25 mg/L, respectivamente, ao fim de apenas 8 dias, enquanto que os teores dos seus precursores diminuíram para apenas 0,28 e 0,77 mg/L.

O 4-etilcatecol, devido aos grupos diol vicinais que possui, é conhecido por ser termicamente lábil às temperaturas requeridas para a análise cromatográfica e por interagir com as fases líquidas e suporte inerte das colunas disponíveis comercialmente. Até à data, a sua detecção e quantificação por GC têm sido descritas na literatura apenas após derivatização (LARCHER *et al*, 2008). O aparecimento do 4-etilcatecol foi mais demorado do que o dos outros etilfenóis mas ao 4º dia após a inoculação das leveduras foi possível a sua detecção sem recorrer a qualquer derivatização prévia. A concentração deste composto atingiu os 1,24 mg/L ao 8º dia após a inoculação, enquanto que a concentração do seu precursor (ácido cafeico) diminuiu para 5,51 mg/L.

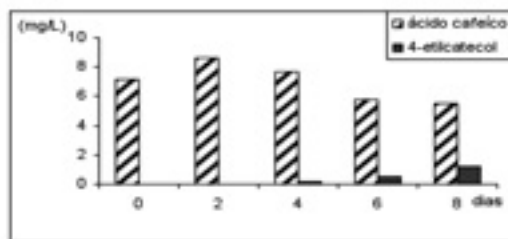


Figura 1 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido cafeico e do 4-etilfenol em meio sintético ao longo do tempo

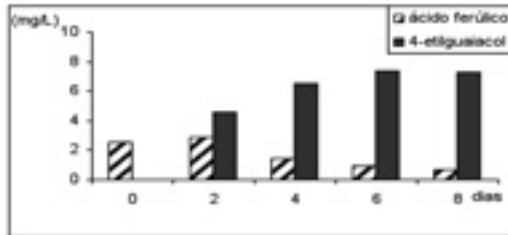


Figura 2 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido *p*-cumárico e do 4-etilfenol em meio sintético ao longo do tempo

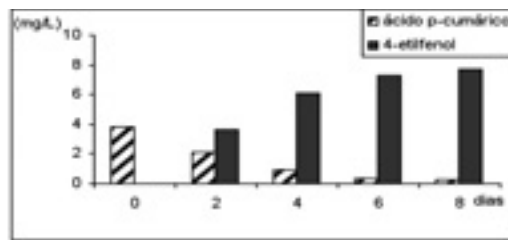


Figura 3 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido ferúlico e do 4-etilguaiaicol em meio sintético ao longo do tempo

A tabela 3 apresenta a taxa de conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis. Esta foi calculada através da razão entre a concentração máxima de etilfenóis obtida e a concentração teórica produzida por 10 mg de ácidos hidroxicinâmicos.

Obtiveram-se taxas elevadas (superiores a 90%) para a conversão do ácido *p*-cumárico em 4-etilfenol e do ácido ferúlico em 4-etilguaiaicol mas a conversão do ácido cafeico em 4-etilcatecol foi reduzida (inferior a 20%). Os valores obtidos justificam o facto dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol serem bem conhecidos pelos enólogos, enquanto que a presença do 4-etilcatecol em vinhos foi referida pela primeira vez há pouco tempo (HESFORD *et al.*, 2004)

Estes resultados parecem indicar que, apesar da abundância do ácido cafeico nos vinhos e da sua semelhança estrutural com a dos outros ácidos hidroxicinâmicos, as leveduras possuem maior afinidade para a conversão dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nos etilfenóis correspondentes.

Na análise dos ácidos hidroxicinâmicos caféico, *p*-cumárico e ferúlico verificou-se uma diferença entre a concentração inicial (10 mg/L) e a concentração detectada por HPLC logo após a inoculação das leveduras. Resultados similares foram anteriormente descritos por vários autores (MEDAWAR, 2003; SALAMEH *et al.*, 2008).

Tabela 3 – taxa de conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis em meio sintético

| Compostos | Concentração obtida (mgL ⁻¹) | Concentração teórica (mgL ⁻¹) | Taxa de conversão (%) |
|---------------|---|--|--------------------------|
| 4-etilguiacol | 7,25 ± 0,53 | 7,84 | 92,47 |
| 4-etilfenol | 7,69 ± 0,36 | 7,44 | 103,36 |
| 4-etilcatecol | 1,24 ± 0,34 | 7,66 | 16,19 |

Nas amostras de vinho inoculadas com *D. bruxellensis* e, principalmente, naquelas às quais se adicionaram os três ácidos hidroxicinâmicos, ocorreu uma diminuição significativa do teor dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico ao longo do tempo, acompanhada pelo aumento da concentração dos etilfenóis correspondentes.

Ao fim de um mês após a inoculação das leveduras detectaram-se concentrações de ácidos hidroxicinâmicos próximas das adicionadas ao vinho (15 mg/L) e o único etilfenol detectado foi o 4-EG. Apesar da degradação destes compostos ocorrer bastante mais lentamente do que em meio sintético, ao fim de dois meses verificou-se uma diminuição da concentração dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico para cerca de metade e detectou-se a presença dos três etilfenóis no vinho, sendo o 4-etilguiacol o mais abundante (8,34 mg/L).

Tabela 4 – Ácidos fenólicos e fenóis voláteis (mg L⁻¹) nas amostras de vinho inoculado

| | amostra | Ácido cafeico | Ácido <i>p</i> -cumárico | Ácido ferúlico | 4-etil guaiacol | 4-etil fenol | 4-etil catecol |
|--------------------|---------|---------------|--------------------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|
| 1 ^o mês | C | 4,15±0,07 | 2,44±0,11 | 0,87±0,05 | 1,28±0,04 | nd | nd |
| | C+A | 15,39±0,28 | 13,23±0,27 | 12,79±1,18 | 1,10±0,06 | nd | nd |
| | Y | 4,98±0,28 | 2,95±0,07 | 0,99±0,01 | 0,90±0,34 | nd | nd |
| | Y+A | 18,21±0,36 | 15,31±0,24 | 16,86±0,39 | 4,16±0,00 | nd | nd |
| 2 ^o mês | C | 5,42±0,55 | 3,08±0,27 | 1,01±0,08 | 0,84±0,47 | nd | 0,07±0,00 |
| | C+A | 17,41±1,46 | 14,59±1,47 | 15,30±0,22 | 0,80±0,14 | 0,18±0,00 | 0,04±0,01 |
| | Y | 4,72±0,22 | 1,44±0,08 | 0,87±0,02 | 1,26±0,14 | 0,47±0,00 | 0,24±0,00 |
| | Y+A | 20,17±1,36 | 8,00±1,03 | 6,90±0,98 | 8,34±0,31 | 3,97±0,17 | 0,33±0,00 |

C – controlo, Y – leveduras; A - ácidos

4 – CONCLUSÕES

A bioconversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis por leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, continua a ser um problema na enologia moderna. Os resultados obtidos nestes ensaios mostram que as leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* são capazes de produzir 4-etilfenol a partir de ácido *p*-coumárico, 4-etilguaiacol a partir do ácido ferúlico e ainda 4-etilcatecol a partir do ácido cafeico. Sendo o ácido cafeico geralmente o mais abundante ácido hidroxicinâmico nos vinhos, não só o 4-etilcatecol é o fenol volátil que aparece em menor concentração, como é aquele que mais tempo leva a aparecer, em igualdade de outros factores.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M., 2006, Food Spoilage Microorganisms. Blackburn, C. (Ed.), Chap 13. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 354–398.
- PIZARRO, C.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M., 2007, Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr A*, 1143, 176–181.
- VALENTÃO P.; SEABRA, R.M.; LOPES, G.; SILVA, L.R.; MARTINS, V.; TRUJILLO, M.E.; VELÁZQUEZ, E.; ANDRADE, P.B., 2007, Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, 100, 64–70
- HESFORD, F., SCHNEIDER, K.; PORRET, N.; GAFNER, J., 2004. Identification and analysis of 4-ethylcatechol in wines tainted by *Brettanomyces*. ASEV 55th annual meeting, San Diego.
- CARRILLO, J.D.; TENA, M.T., 2007. Determination of ethylphenols in wine by *in situ* derivatization and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 387, 2547-2558.
- LARCHER, R.; NICOLINI, G.; BERTOLDI D.; NARDIN, T.; 2008, Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography–coulometric electrochemical array detection, *Analytica Chimica Acta*, 609, 235-240.
- MEDAWAR, W.; 2003, Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte oenologique. Institute polytechnique de Toulouse et Université Saint Joseph de Beyrouth.
- SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREHAIANO, P.; 2008, High-light on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations, *Food Chemistry*, 107, 1661-1667.

UTILIZAÇÃO DE APARAS DE MADEIRA NO ENVELHECIMENTO DE VINHOS TINTOS: QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICAS DE MADEIRAS POR HPLC

Raquel GARCIA¹; Margarida VIEIRA²; Maria João CABRITA^{1,3}

RESUMO

O uso de aparas de madeira para fins enológicos tem vindo a ser explorado pois surge como uma alternativa menos dispendiosa, comparativamente ao uso de barricas, para além de promover o envelhecimento de forma mais célere. Dado que a aplicação de aparas de madeira para o envelhecimento de vinhos elimina a problemática associada ao uso de madeira própria para tanoaria torna-se pertinente o estudo da aplicabilidade de outras espécies de madeira, para além do carvalho, no estágio de vinhos. Assim, este trabalho visa o estudo da composição fenólica de madeiras de castanheiro e carvalho (nacional, francês e americano) para a sua aplicação sob a forma de aparas ou dominós para fins enológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos fenólicos, aparas de madeira, PLE (pressurized liquid extraction), HPLC-DAD

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento do vinho é vulgarmente utilizado em enologia conduzindo a um incremento na qualidade do produto final. A madeira utilizada durante este processo apresenta capacidade para introduzir modificações físico-químicas e sensoriais no vinho, resultantes da extracção e degradação de diversos compostos da madeira, contribuindo para o aumento da complexidade organoléptica dos vinhos

¹ Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Email: raquelg@uevora.pt

² Aluna do mestrado de Viticultura e Enologia da Universidade de Évora.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal.

(PÉREZ-MAGARIÑO *et al.*, 2009). Estas propriedades encontram-se intimamente relacionadas com as características específicas da madeira, nomeadamente a espécie botânica, a origem geográfica, a variabilidade da composição anatómica, a composição química, assim como, os tratamentos tecnológicos realizados na indústria de tanoaria (CÉRDAN *et al.*, (2006)). Os compostos fenólicos representam um dos grupos de substâncias químicas que se encontram presentes em vinhos que estagiaram em madeira, influenciando significativamente diversas características do vinho, tais como a cor, o aroma e a adstringência (CABRITA *et al.*, 2008).

No entanto, o uso de barricas de madeira no envelhecimento de vinhos é um processo dispendioso, pelo que, se tornou frequente o recurso a tecnologias alternativas de utilização de madeiras, nomeadamente o uso de fragmentos de madeira de carvalho. Assim, este trabalho tem como objectivo avaliar a possibilidade de utilizar outras espécies de madeira, para além do carvalho, para fins enológicos. Para a concretização deste objectivo, o trabalho desenvolvido focou-se fundamentalmente na optimização de um método de extracção com líquido pressurizado (PLE) dos compostos fenólicos presentes em madeiras de castanho nacional e carvalho (nacional, francês e americano) e posterior quantificação destas substâncias, utilizando o método do padrão interno, recorrendo à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-DAD).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Compostos padrão

Os compostos padrão utilizados neste trabalho foram:

5-hidroximetilfurfural (5-OHMefurf), 5-metilfurfural (5-Mefurf), seringaldeído (sering) adquiridos à Acros Organics; sinapaldeído (sinap) e coniferaldeído (conif) adquiridos à Aldrich; ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido ferúlico adquiridos à ExtraSynthèse; furfural (furf) e vanilina (vanil) adquiridos à Merck. O composto 4-hidroxibenzaldeído, adquirido à Lancaster, foi utilizado como padrão interno.

2.2- Aparas de madeira

As aparas de madeiras de castanheiro e carvalho nacional, francês e americano foram fornecidas pela J.M. Gonçalves- Tanoaria, Lda. As aparas de madeira utilizadas neste estudo apresentam uma dimensão 3 e um nível de tosta médio.

2.3- Equipamento

A extração dos compostos fenólicos das aparas de madeira foi efectuada num extractor com líquido pressurizado (Dionex, ASE 100) equipado com uma célula de extração de 10 mL.

As análises cromatográficas foram realizadas num sistema cromatográfico da marca Dionex, equipado com um detector DAD. O controlo, aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foi efectuada recorrendo ao software “Chromleon” (Dionex).

2.4- Método cromatográfico

O método cromatográfico utilizado baseou-se no método desenvolvido por Canas *et al.* (2003), o qual permite simultaneamente a identificação e determinação dos ácidos fenólicos, dos aldeídos fenólicos e dos derivados furânicos. Contudo, neste trabalho foram introduzidas algumas alterações ao método descrito por Canas *et al.* (2003) de forma a otimizar a separação dos compostos 5-Mefurf, ácido síringico e vanilina. As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram as seguintes: fase estacionária- coluna cromatográfica Merck Lichrospher RP18, 250 mm × 4 mm (5µm); temperatura da coluna 40°C, fluxo 1 mLmin⁻¹, volume injectado 25µL, gradiente binário constituído pelos solventes: solução aquosa de ácido fórmico (2%) (Eluente A) e solução de metanol: água: ácido fórmico (70:28:2 (v/v/v)) (Eluente B); método cromatográfico: gradiente linear de 0% a 40% B em 45 min seguido de gradiente linear de 40% a 60% B em 20 min. Os compostos fenólicos em estudo foram quantificados ao comprimento de onda de 280 nm.

2.5- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.5.1- Traçado das rectas de calibração dos padrões

Para o traçado das rectas de calibração prepararam-se soluções dos compostos padrão em metanol/água (1:1(v/v)), a partir de soluções mãe, com diferentes concentrações. Na tabela 1 encontram-se indicadas as concentrações das soluções mãe dos compostos padrão, assim como, as gamas de concentrações das soluções utilizadas para o traçado das rectas de calibração, para posterior quantificação dos compostos em estudo.

Tabela 1- Dados relativos às soluções padrão utilizados para o traçado das curvas de calibração

| Composto padrão | Concentração da solução mãe (mgL⁻¹) | Intervalo de concentrações (mgL⁻¹) |
|------------------------|---|--|
| Ácido gálico | 1706 | 8,53- 1279,5 |
| 5-OHMefurf | 1190 | 1,19- 119,0 |
| Furf | 1128 | 1,13- 112,8 |
| Ácido vanílico | 1702 | 8,51- 170,2 |
| 5-Mefurf | 1186 | 5,93- 118,6 |
| Ácido siringico | 1994 | 9,95- 199,0 |
| Vanilina | 154 | 7,70- 154,0 |
| Seringaldeído | 1838 | 9,19- 294,08 |
| Ácido ferúlico | 1954 | 9,77- 195,4 |
| Coniferaldeído | 1796 | 8,98- 359,2 |
| Sinapaldeído | 2114 | 10,57- 845,6 |

Para a quantificação dos compostos fenólicos em estudo foi utilizado o método do padrão interno (PI). Assim, a cada uma das soluções padrão foi adicionada um volume de solução mãe de 4-hidroxibenzaldeído (4,08 gL⁻¹) de modo que este composto esteja presente em todas amostras com uma concentração de 20,4 mgL⁻¹. As alíquotas das soluções padrão foram analisadas, em duplicado, por HPLC. Procedeu-se ao traçado das curvas de calibração A/Api (onde A corresponde à área do pico do composto em análise e Api é a área do pico correspondente ao PI) em função da concentração do analito.

2.5.2- Extracção dos compostos fenólicos das aparas de madeira por Extracção com líquido pressurizado (PLE)

As amostras de aparas de madeira foram previamente submetidas a uma moagem. A extracção dos compostos fenólicos presentes nas aparas de madeira foi efectuada num extractor com líquido pressurizado, equipado com uma célula de extracção de 10 mL. O processo de extracção envolveu a homogeneização de 500 mg de amostra de madeira com terra de diatomáceas e acondicionamento da mistura na célula de extracção, como esquematizado na figura 1.

Figura 1- Representação esquemática da extracção dos compostos fenólicos de aparas de madeira utilizando um extractor com líquido pressurizado.



Durante a optimização do processo de extracção dos compostos foram utilizados como solventes o diclorometano e o metanol, temperaturas de aquecimento de 100°C e 150°C e diferentes ciclos de extracção. O extracto foi evaporado no evaporador rotativo e, em seguida, o resíduo obtido foi dissolvido em 1990 μL de solução de metanol/água (1:1(v/v)) e adicionada uma alíquota de 10 μL de solução de padrão interno de concentração 4,08 gL^{-1} , de modo a que a sua concentração final de padrão interno seja de 20,4 mgL^{-1} . Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de seringa de 0,45 μm (SartoriusStedim) e analisadas em HPLC por injeção directa de 25 μL da solução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Traçado da recta de calibração dos compostos padrão

Este trabalho envolveu a prévia preparação de soluções de compostos padrão de diferentes concentrações. A análise cromatográfica de alíquotas destas soluções, por HPLC, permitiu o traçado de curvas de calibração de A/A_{pi} em função da concentração de soluções dos compostos padrão. Na tabela 2 encontram-se representados os parâmetros relativos às curvas de calibração para cada um dos compostos em estudo.

Tabela 2- Parâmetros das curvas de calibração para os compostos padrão

| Composto padrão | Curva de calibração | | |
|---------------------|---------------------|-----------|------------|
| | $m^{(a)}$ | $b^{(b)}$ | $r^{2(c)}$ |
| Ácido gálico (1) | 0,0191 | -0,1346 | 0,9999 |
| 5-OHMeFurf (2) | 0,0503 | 0,01 | 0,9998 |
| Furf (3) | 0,0632 | -0,0062 | 1 |
| Ácido vanílico (4) | 0,0118 | 0,0059 | 0,9998 |
| 5-MeFurf (5) | 0,0454 | 0,0066 | 1 |
| Ácido siríngico (6) | 0,0209 | -0,0021 | 0,9989 |
| Vanilina (7) | 0,0325 | -0,1199 | 0,9995 |
| Siringaldeído (8) | 0,0122 | -0,0031 | 1 |
| Ácido ferúlico (9) | 0,0177 | -0,0435 | 0,9966 |
| Coniferaldeído (10) | 0,0103 | -0,002 | 1 |
| Sinapaldeído (11) | 0,0051 | -0,0471 | 0,9983 |

^{a)} declive da curva de calibração; ^{b)} ordenada na origem; ^{c)} coeficiente de correlação.

3.2- Extracção dos compostos fenólicos das aparas de madeira por Extracção com líquido pressurizado (PLE)

Na tentativa de optimização de um método de extracção com líquido pressurizado (PLE) para a extracção dos compostos fenólicos presentes em aparas de madeira foram testadas diversas condições experimentais, tais como: o solvente de extracção (metanol/ diclorometano), a temperatura (100°C/ 150°C) e o número de ciclos de extracção (2/3). A análise dos cromatogramas de HPLC referentes aos extractos obtidos, utilizando diferentes condições experimentais, permitiu concluir que o método de extracção que utilizava como solvente o metanol, uma temperatura de 150°C e 3 ciclos de extracção era o mais adequado para esta finalidade uma vez que permitia extrair um maior número e uma maior quantidade de compostos fenólicos das amostras de madeira, como ilustrado na figura 2.

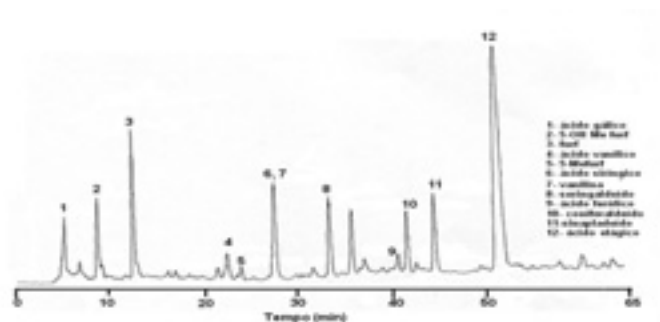


Figura 2- Cromatograma de HPLC correspondente à extração dos compostos fenólicos de aparas de carvalho francês por PLE (Condições: T=150°C; Solvente: metanol; 3 ciclos de extração). As condições cromatográficas encontram-se descritas na secção 2.4.. Os compostos assinalados foram identificados por comparação do tempo de retenção com os dos compostos padrão.

3.3- Quantificação dos compostos fenólicos presentes nas diferentes espécies de madeiras por HPLC

Após a optimização do processo de extração dos compostos fenólicos por PLE, procedeu-se à identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos presentes nas diferentes espécies de madeiras em estudo. Os resultados obtidos encontram-se sumariados nas figuras 4 e 5.

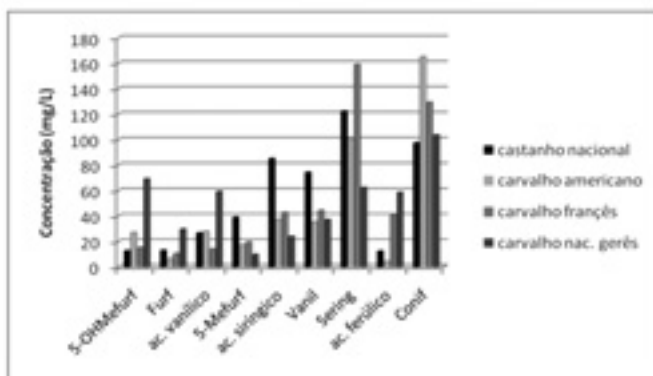


Figura 4- Histograma referente à composição fenólica de aparas de madeira de castanho nacional e carvalho (americano, francês e nacional).

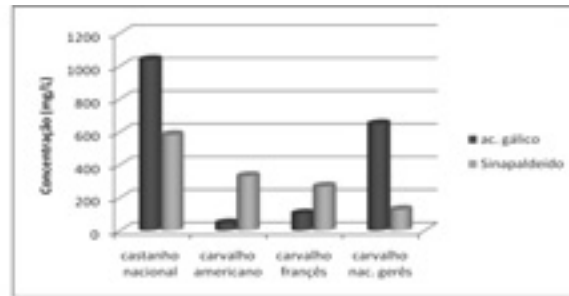


Figura 5- Histograma relativo à concentração em ácido gálico e sinapaldeído nas aparas de madeira de castanho nacional e carvalho (americano, francês e nacional).

É de salientar que este estudo incidiu sobre aparas de madeira que apresentam a mesma dimensão e foram submetidas ao mesmo tipo de tratamento térmico e, deste modo, as diferenças observadas ao nível da composição fenólica são exclusivamente provenientes da espécie botânica e da origem geográfica dessas madeiras. Assim, constatou-se que a intensidade dos compostos extraídos das aparas de madeira varia consoante a espécie em estudo, sendo que a espécie botânica parece ser mais importante do que a origem geográfica para a composição fenólica destas madeiras, tal como referido por CANAS *et al.* (2000). Por observação das figuras 4 e 5 é notório que o ácido gálico e o sinapaldeído encontram-se presentes em concentrações elevadas em todas as espécies de madeira estudadas, apresentando os teores mais elevados no castanho nacional, estando esta constatação de acordo com os resultados descritos por CANAS *et al.* (2000). Relativamente aos derivados furânicos (5-OHMefur e furf) os seus teores são mais elevados nas aparas de madeira de carvalho nacional do Gerês do que nas restantes espécies de madeira estudadas. Em relação aos ácidos fenólicos, o ácido siríngico encontra-se presente em concentração mais elevada no castanho nacional do que nas aparas de madeira de carvalho enquanto que o ácido ferúlico é mais abundante no carvalho nacional e francês.

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível otimizar um método de extracção de compostos fenólicos de aparas de madeira baseado em PLE e elaborar um estudo sistemático que permitiu correlacionar a composição fenólica de madeiras de castanheiro e carvalho (nacional, francês e americano). Encontra-se em curso a avaliação da composição fenólica de aparas destas espécies de madeira com aparas de dimensões diferentes e variados níveis de tosta, com o objectivo de avaliar a influência destes parâmetros nos teores dos compostos fenólicos extraídos, perspectivando-se, posteriormente, o alargamento destes estudos ao vinho.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à J.M. Gonçalves- Tanoaria, Lda. o fornecimento das aparas de madeira utilizadas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRITA M.J., TORRES M., PALMA V., ALVES E., PATÃO R., COSTA FREITAS A.M., 2008, Impacto of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta* **74**, 1281- 1286.
- CANAS S., Leandro M.C., Spranger M.I., Belchior A.P., 2000 Influence of botanical species and geographical origin on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage, *Holzforschung*, **54**, 1-7.
- CANAS S., BELCHIOR A.P., SPRANGER M. I., BRUNO-de-SOUSA R., 2003, High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.* **26**, 496- 502.
- CÉRDAN T.G., ANCÍN-AZPILICUETA C., 2006, Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization, *LWT* **39**, 199- 205.
- PÉREZ-MAGARIÑO S., ORTEGA-HERAS M., CANO-MOZO E., GONZÁLEZ-SANJOSÉ M. L., 2009, 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* **22**, 3, 204- 211.



DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO ECONÓMICO DE PRODUÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES SELECCIONADAS PARA ELABORAR VINHOS À ESCALA LOCAL

Francisco PÉREZ-NEVADO¹, Matilde MAQUEDA², José A. REGODÓN³,
Emiliano ZAMORA⁴, M. Luz ÁLVAREZ⁴, Manuel RAMÍREZ²

RESUMO:

Foi delineado um esquema económico para produzir leveduras enológicas à escala local. A partir de quatro leveduras seleccionadas pela sua boa qualidade microbiológica e pelas suas propriedades enológicas adequadas foi produzido um concentrado de leveduras frescas. Os melhores rendimentos foram alcançados com melaço de beterraba diluído com 2% de açúcares fermentescíveis, e volumes de cultura inferiores a 60% da capacidade do fermentador. Com mosto de uva diluído (2% de açúcares) o rendimento foi mais baixo e as leveduras apresentaram uma baixa viabilidade após o seu armazenamento a -20°C, embora estas pudessem ser utilizadas directamente na vinificação. As leveduras produzidas foram inoculadas em vinificações, à escala industrial, mostrando um excelente comportamento, dominaram a fermentação e melhoraram a cinética de fermentação, tendo dado origem a vinhos de boa qualidade.

Palavras chave: leveduras enológicas autóctones, produção económica, vinificação local, qualidade do vinho.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de leveduras enológicas seleccionadas permite controlar a fermentação evitando que outros microrganismos indesejáveis dominem, dando origem a vinhos

¹Departamento de Produção Animal e Ciência dos Alimentos, Escuela de Ingenierías Agrárias, Universidade da Extremadura (UEX), Ctra. de Cáceres s/n, 06006 Badajoz, Espanha. E-mail: *fpen@unex.es*.

²Departamento de Microbiología, Faculdade de Ciências, UEX, 06006 Badajoz, Espanha.

³Departamento de Química Analítica, Faculdade de Ciências, UEX, 06006 Badajoz, Espanha.

⁴Estação Enológica, Junta da Extremadura, Almendralejo, Badajoz, Espanha.

padronizados e de elevada qualidade (MELERO, 1992). Dada a crescente procura de leveduras enológicas seleccionadas para elaborar vinhos de qualidade, nos últimos tempos a produção destas leveduras sofreu um forte aumento.

As leveduras são comercializadas sob a forma de leveduras frescas ou sob a forma de Leveduras Secas Activas (LSA), sendo as LSA as que se consideram mais adequadas para a utilização em vinificação. No entanto, as LSA têm de ser reactivadas antes da sua utilização e a sua produção tem um custo elevado (PÉREZ-NEVADO *et al.*, 2003). Por outro lado, as leveduras frescas apresentam uma maior viabilidade, têm custos de produção inferiores e não necessitam de rehidratação prévia, podendo ter uma grande utilidade para produzir vinhos em zonas próximas.

As leveduras enológicas locais poderiam ser produzidas mediante pedido num local de produção próximo das adegas imediatamente antes ou durante a fase da vindima, e serem comercializadas como cultura concentrada líquida para a inoculação do mosto. O objectivo do presente trabalho foi delinear um processo económico para dar resposta à exigência de leveduras enológicas frescas para a sua utilização à escala local. Foi analisada a qualidade microbiológica, de uma cultura de leveduras frescas produzida com quatro estirpes seleccionadas, bem como a sua utilidade na produção de vinho de qualidade.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Estirpes de leveduras

Foram utilizadas quatro estirpes de leveduras *S. cerevisiae* (EX88, E7AR1, SMR165AR e Rod256D), todas autóctones ou obtidas a partir de leveduras autóctones da D.O. Ribera del Guadiana (REGODÓN *et al.*, 1997; PÉREZ *et al.*, 2000; AMBRONA *et al.*, 2005 e 2006).

2.2 Montagem de um esquema piloto

Foi desenvolvido um ciclo de produção de 24 horas, que se inicia com um volume inicial de 10% do volume teórico final, para se conseguir um concentrado de leveduras frescas 10x superior após a centrifugação da cultura, com uma população de $2-4 \times 10^9$ leveduras viáveis/mL. Foram utilizados dois fermentadores de aço inoxidável de baixo custo, um de 100 L de capacidade, utilizado para as produções de leveduras de 25, 50 e

75 L; e outro de 350 L, para as de 100, 200 e 300 L. Antes de cada produção, todos os componentes do equipamento foram lavados e esterilizados com vapor de água.

Os inóculos para as produções de 25 e 50 L foram obtidos através do crescimento das leveduras em meio de cultura líquido e estéril YEPD em agitação. Os inóculos das produções de 100, 200 e 300 L foram obtidos a partir das produções de 50 L. Na figura 1, é demonstrado o diagrama de produção seguido. Durante as primeiras 20 horas adicionou-se à cultura de leveduras uma fonte de carbono (melaço ou mosto de uva) com recurso a uma bomba peristáltica; Os valores da concentração de açúcares na cultura foram mantidos abaixo de 0,005%.

O arejamento e a agitação da cultura de leveduras foram realizados com uma bomba de ar (0.5-1.5 m³/min). A produção foi realizada à temperatura ambiente. Quando necessário, foi adicionado um anti-espuma de uso alimentar (Antifoam 64, Sigma-Aldrich). Uma vez finalizada a adição da fonte de carbono, a cultura foi mantida com arejamento durante mais 4 horas. Finalmente, a cultura de leveduras foi lavada com água esterilizada, concentrada (10 vezes) por centrifugação e congelada a -20°C.

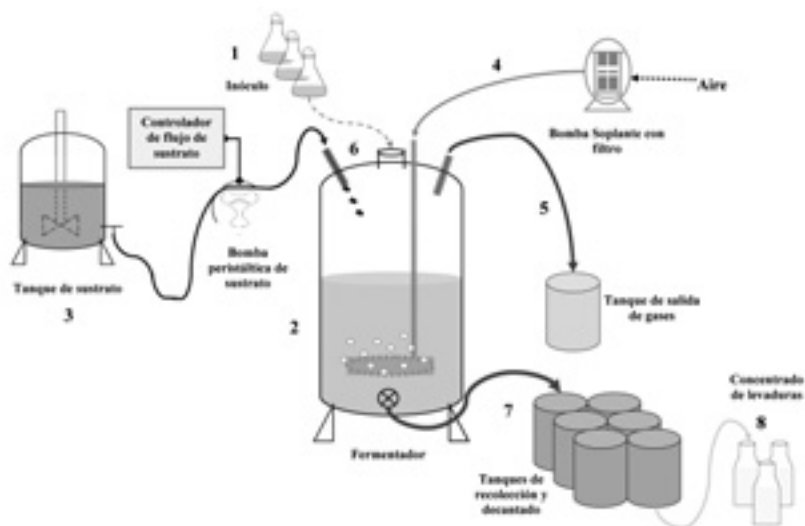


Figura 1. Diagrama do processo de produção de leveduras enológicas à escala piloto.

1. Produção do inóculo; 2. Preparação do meio de base no fermentador; 3. Preparação da fonte de carbono; 4. Arejamento; 5. Saída de gases; 6. Inoculação e fornecimento da fonte de carbono; 7. Recolha e concentração de leveduras; 8. Conservação.

2.3 – Meio de base inicial e preparação da fonte de carbono

Foram utilizados dois meios de base iniciais; um para as produções com melaços (2 g/L de extracto de levedura, 0.75 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, e 1 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1-5 mg/L tiamina, 0.125 mg/L biotina, 10 mg/L pantotenato cálcico; com pH ajustado a 6.6-6.8) e outro para as produções com mosto de uva (2 g/L extracto de levedura, 8 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 0.6 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, e 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1-5 mg/L tiamina, 0.125 mg/L biotina, 10 mg/L pantotenato cálcico; com pH ajustado a 5.2-5.3).

Quando se utilizaram melaços de beterraba como fonte de carbono, estes foram diluídos com água até às concentrações de açúcar desejadas (1, 1.5, 2 y 2.5%), e os valores de pH foram ajustados para 3.5-4. Nas restantes produções utilizou-se o mosto de uva sulfitado como fonte de carbono, que se diluiu com água até uma concentração de açúcares de 2%.

2.4 – Controlo de qualidade do processo e do produto

Durante o processo de produção das leveduras foram monitorizados os parâmetros de $\text{DO}_{600\text{nm}}$, pH e temperatura. O controlo microbiológico foi realizado através da observação microscópica e plaqueamento em placas de petri para determinação da presença de bactérias (coliformes, enterobactérias, bactérias acéticas e bactérias ácido lácticas), fungos e leveduras de contaminação. Para a determinação do peso seco da cultura, as amostras (10-20 mL) foram filtradas através de filtros de papel Whatman N°2, lavadas duas vezes e finalmente foram sujeitas a um processo de secagem a 105°C até atingirem um peso constante.

2.5 – Ensaios de vinificação

Foram realizadas vinificações com as leveduras produzidas, utilizando mosto fresco das castas de uvas brancas (Cayetana, Pardina, Eva e Montúa) ou uvas desengaçadas e esmagadas da casta tinta Tempranillo, procedeu-se à inoculação até uma concentração final de $1-2 \times 10^7$ células/mL. Para cada grupo de vinificações foi realizada uma vinificação testemunha, sem inoculação. No total, foram produzidos 40 vinhos. O processo de vinificação foi levado a cabo em depósitos de aço inoxidável de 1000-5000L, a temperaturas de 18°C para os vinhos brancos e a 24°C para os tintos. A densidade do mosto e os °Brix foi controlada diariamente. No final dada fermentação os vinhos foram

trasfegados e foram retiradas amostras para o controlo físico-químico. Foram determinados os seguintes parâmetros: °Brix, pH, acidez total, acidez volátil, açúcares redutores, álcool, ácido málico e ácido láctico. Após 105 dias desde o final da fermentação, os vinhos foram provados por um painel de 12 especialistas. Foi determinado o T15 (tempo necessário para fermentar 15% do total de açúcares do mosto), e T100 (tempo necessário para fermentar 100% dos açúcares). A frequência de implantação das leveduras inoculadas foi determinada mediante marcadores genéticos.

2.6 – Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) e paramétricos (ANOVA), utilizando o software SPSS versão 15.0 para Windows (Chicago, IL).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Parâmetros ambientais durante a produção de leveduras

Foram realizadas 49 produções de leveduras, 36 com melão e 13 com mosto de uva. Devido à evaporação durante o processo, o volume final recuperado foi de 86-97% do volume teórico final. A temperatura da cultura manteve-se entre 26 e 29°C, muito próxima da temperatura ideal para a produção de leveduras, de 28.5-30°C (Kristiansen, 1994). Após a inoculação, a DO_{600nm} inicial da cultura estava próxima de 4, alcançando uma DO de aproximadamente 45 no final do processo. Apesar do pH inicial do meio base ser elevado, após duas horas de adição da fonte de carbono, diminuiu para valores de 3.0 aproximadamente, mantendo-se com baixos valores de pH durante toda a produção.

3.2 – Qualidade microbiológica e estabilidade das leveduras durante a conservação

Através de microscopia óptica observou-se que a maioria das leveduras produzidas era constituída por culturas puras de leveduras viáveis (mais de 95% de viabilidade). Apenas foram encontradas contaminações, com bactérias lácticas, em duas produções; o que foi justificado por uma falha no controlo do pH.

3.3 – Influência de diversos factores no rendimento da produção

Foi estudada a influência da concentração de açúcar no rendimento das produções de leveduras realizadas com melaço. O rendimento aumentou com o aumento das concentrações de açúcar entre 1% e 2%; acima da qual diminui drasticamente (**Tabela 1**). Isto deve-se à alteração do metabolismo respiratório para o metabolismo fermentativo (Efeito *Crabtree*) a elevadas concentrações de açúcares (KRISTIANSEN, 1994).

| Rendimento | Percentagem de açúcares adicionados ^a | | | | p ^b |
|-------------------|--|----------|----------|---------|----------------|
| | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | |
| g levedura seca/L | 18,0±2,0 | 22,5±0,9 | 34,1±0,1 | 4,4±0,1 | ** |

^aPercentagem de açúcares adicionados referente ao volume teórico final. ^bvalor de p obtido com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (** p<0,01).

Tabela 1. Influência da concentração de açúcar no rendimento das produções de leveduras.

O rendimento das produções com mosto de uva a 2% foi significativamente inferior ao obtido com 2% de melaço (**Tabela 2**). No entanto, com mosto obteve-se uma concentração mais elevada de UFC/g de leveduras do que nas produções com melaço, podendo compensar em parte o seu baixo rendimento. Após estarem congeladas durante um mês, as leveduras produzidas com melaço mantiveram uma viabilidade significativamente superior quando comparadas com as leveduras produzidas com mosto.

| Rendimento | Fonte de carbono | | p ^a |
|--------------------------------|---------------------------------------|--|----------------|
| | Melaços | Mosto de uva | |
| g levedura seca/L | 34,1±0,1 | 14,9±1,5 | 0,000 |
| CFU/g levedura seca | $7,2 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^9$ | $1,1 \times 10^{10} \pm 1,2 \times 10^9$ | 0,05 |
| % viabilidade após conservação | 72,5±3,8 | 13,7±5,5 | 0,016 |

^aValores de p obtidos com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Influência da fonte de carbono utilizada no rendimento das leveduras produzidas e viabilidade após um mês de congelação.

Relativamente ao efeito do volume de cultura no rendimento das leveduras, os rendimentos obtidos na maioria das produções foram considerados satisfatórios, excepto os de 75 L e 250 L (**Tabela 3**). Em cada fermentador, os rendimentos mais elevados foram obtidos com os volumes de cultura mais baixos (25 L no fermentador de 100 L e 100 L no de 350 L).

| Rendimento | Fermentador 100 L | | | Fermentador 350 L | | |
|-------------------|-------------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|
| | 25 L | 50 L | 75 L | 100 L | 200 L | 250 L |
| g levedura seca/L | 34,3±2,9 | 23,1±1,0 | 12,7±0,3 | 27,9±0,4 | 22,5±2,0 | 11,3±1,0 |

Todas as diferenças foram estatisticamente significativas (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$)

Tabela 3. Influência do volume de cultura no rendimento da produção de leveduras.

Por último, não foram encontradas diferenças de rendimento nas estirpes ensaiadas (**Tabela 4**), provavelmente porque estas estirpes apresentavam alguma relação genética. Considera-se que o rendimento obtido foi aceitável com todas as leveduras testadas.

| Rendimento | Estirpe de levedura | | | | p* |
|-------------------|---------------------|----------|----------|----------|-------|
| | EX88 | E7ARI | SMR165AR | Red256D | |
| g levedura seca/L | 26,7±2,8 | 26,7±2,8 | 26,7±1,7 | 26,0±2,1 | 0,980 |

*Valores de p obtidos mediante o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Rendimento em peso das produções de quatro estirpes de leveduras realizadas utilizando melações.

3.4 – Vinificações industriais com as leveduras produzidas

Todas as leveduras inoculadas apresentaram parâmetros de fermentação similares (T15 e T100), enquanto as fermentações não inoculadas foram muito mais lentas. Nas vinificações inoculadas a frequência de implantação das leveduras inoculadas (determinadas mediante marcadores genéticos) encontraram-se entre 77% e 99%.

A inoculação com leveduras produziu uma diminuição do número de microrganismos indesejáveis durante a fermentação por comparação com as testemunhas, sem inoculação (dados não apresentados). Ao analisar os dados das análises físico-químicas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os vinhos obtidos com

leveduras produzidas e os vinhos testemunha; sem inoculação de leveduras. (Tabela 5). Os resultados das análises físico-químicas dos vinhos indicam que são adequados para vinhos de qualidade. A qualidade sensorial (aceitação) foi maior nos vinhos inoculados, embora, para os vinhos brancos, as diferenças não tenham sido significativas.

Tabela 5. Parâmetros da fermentação de mosto e resultados de análises dos vinhos vinificados com leveduras inoculadas produzidas e dos vinhos testemunha sem inoculação.

| Parâmetro ^a | Vinhos tintos | | | | | P ^b |
|------------------------|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| | Testemunha | EX88 | E7ARI | SMR165AR | Rod256D | |
| T15 (dias) | 4.4±0.3B | 2±0.4A | 1.7±0.3A | 1.8±0.2A | 1.8±0.3A | 0.000 |
| T100 (dias) | 6.8±0.2B | 4.4±0.6A | 4.2±0.3A | 4.5±0.4A | 4.6±0.5A | 0.001 |
| Freq. (%) | 0±0A | 98±1.5B | 100±0B | 99.4±0.4B | 99.9±0.1B | 0.000 |
| *Alcoólico | 12.85±0.42 | 13.5±0.42 | 12.33±0.45 | 12.53±0.33 | 12.82±0.55 | 0.898 |
| pH | 3.53±0.04 | 3.51±0.05 | 3.5±0.05 | 3.57±0.05 | 3.58±0.03 | 0.68 |
| AT (g/L) | 6.82±0.52 | 7.07±0.73 | 7.38±0.67 | 7.21±0.36 | 7.06±0.82 | 0.976 |
| AV (g/L) | 0.25±0.37 | 0.19±0.18 | 0.2±0.02 | 0.22±0.02 | 0.26±0.02 | 0.126 |
| AR (g/L) | 0.42±0.15B | 0.12±0.08A | 0.1±0.06A | 0.1±0.06A | 0.07±0.04A | 0.042 |
| Âc. Málico (g/L) | 1.69±0.3 | 2±0.2 | 2.31±0.2 | 2±0.2 | 2.05±0.05 | 0.286 |
| Âc. Láctico (g/L) | 0.38±0.14B | 0.11±0.05A | 0.07±0.03A | 0.14±0.03A | 0.1±0.02A | 0.018 |
| Aceitação (%) | 49.55±12.2A | 66.2±1.1AB | 69.6±1.9B | 67.2±3AB | 68.3±2.1B | 0.142 |
| T15 (dias) | 3.85±0.5B | 2.29 ±0.8A | 1.9±0.5A | 1.6±0.2A | 1.95±0.4A | 0.02 |
| T100 (dias) | 15.7±1.7B | 10.7±0.9A | 9.97±0.98A | 11.2±0.7A | 10.9±1.4A | 0.017 |
| Freq. (%) | 0±0A | 85±9.6B | 97±1.3B | 98±1.1B | 99±0.6B | 0.000 |
| *Alcoólico | 13.2±0.4 | 13.3±0.2 | 13.2±0.2 | 12.9±0.2 | 13±0.3 | 0.861 |
| pH | 3.41±0.05 | 3.35±0.04 | 3.38±0.04 | 3.33±0.04 | 3.32±0.02 | 0.423 |
| AT (g/L) | 6.28±0.12A | 6.45±0.26A | 6.58±0.51A | 6.78±0.29AB | 7.71±0.28B | 0.063 |
| AV (g/L) | 0.52±0.08B | 0.28±0.07A | 0.29±0.03A | 0.21±0.020A | 0.4±0.07B | 0.002 |
| AR (g/L) | 1.47±0.45B | 0.35±0.18A | 0.38±0.14A | 0.37±0.2A | 0.6±0.21A | 0.023 |
| Âc. Málico (g/L) | 1.22±0.4 | 1.7±0.4B | 1.9±0.27 | 1.6±0.23 | 1.6±0.19 | 0.558 |
| Âc. Láctico (g/L) | 0.29±0.16B | 0.03±0.03A | 0.04±0.035A | 0.06±0.034A | 0.01±0.006A | 0.068 |
| Aceitação (%) | 67.2±3.4 | 59.2±3.5 | 59.2±2.4 | 60.3±5 | 63.2±2.8 | 0.485 |

^aFreq.= Frequência de leveduras inoculadas; AT= acidez total em g/L de ácido tartárico; AV= acidez volátil em g/L de ácido acético; AR= açúcares redutores.

^bp valores obtidos com ANOVA. Os valores seguidos de letras (A, B, C y D) indicam diferentes grupos homogêneos obtidos com o teste de Duncan com um nível de confiança de 95%.

4 - CONCLUSÕES

O nosso ensaio experimental permitiu a produção de leveduras enológicas com uma grande percentagem de células viáveis e uma boa qualidade microbiológica, para além de manter um pH adequado, inferior a 4. Os melhores rendimentos foram obtidos com melaços a uma concentração final de açúcar de 2% e com volumes de cultura inferiores a 60% da capacidade do fermentador. Não foram encontradas diferenças de rendimento entre as quatro estirpes de leveduras utilizadas. A melhoria tecnológica obtida através da inoculação de leveduras seleccionadas durante a vinificação é também alcançada conseguida utilizando leveduras enológicas produzidas no nosso esquema-piloto de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelos projectos 2PR01B002 e 2PR04B003 (Junta de Extremadura, Espanha). Matilde Maqueda foi bolseira do Ministério da Educação e Ciência (Espanha).

BIBLIOGRAFIA

- Ambrona J., Maqueda M., Zamora E. and Ramírez M. (2005). Sulfometuron resistance as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J Agric Food Chem* **53**: 7438-7443.
- Ambrona J., Vinagre A., Maqueda M., Álvarez M.L. and Ramírez M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J Agric Food Chem* **54**: 2977-2984.
- Kristiansen B. (1994). Integrated design of a fermentation plant. The production of Baker's yeast. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH.
- Melero R. (1992). Fermentación controlada y seleccion de levaduras vinicas. *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment* **32**: 371-379.
- Pérez F., Regodón J.A., Valdés M.E., De Miguel C. and Ramírez M. (2000). Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiol* **17**: 119-128.
- Pérez-Nevado F., Regodón J.A.; Ramírez M. (2003). Producción de Levaduras Secas Activas (LSA)

para vinificación con levaduras autóctonas seleccionadas de la D.O. Ribera del Guadiana. Alimentaria, Enero-Febrero, 139-145.

Regodón J.A., Pérez F., Valdés M.E., De Miguel C. and Ramírez,M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol* **14**: 247-254.

UTILIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS TRATADAS PARA REGA DA VINHA E SUA INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MOSTO

Ana NEVES^{1,2}, Sofia CATARINO^{1,2*}, Raul BRUNO DE SOUSA²

RESUMO

Os teores de alumínio (Al), crómio (Cr), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), arsénio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram monitorizados em mostos obtidos a partir de uvas originárias de uma vinha regada com águas residuais tratadas numa ETAR. Crómio, As e Cd apresentaram-se em teores inferiores aos limites de quantificação dos respectivos métodos de análise. As concentrações dos restantes elementos variaram nos seguintes intervalos: 1,1 a 3,7 mg/L (Al); 0,85 a 3,3 mg/L (Fe); 7 a 11 µg/L (Ni); 0,27 a 0,65 mg/L (Cu) e 6 a 8 µg/L (Pb). Os resultados obtidos sugerem que não ocorreu contaminação assinalável das uvas, uma vez que, com excepção do Al, os mostos apresentaram teores baixos destes elementos contaminantes. Os teores de Al, ligeiramente superiores aos normalmente observados em mostos, poderão estar relacionados com a qualidade da água residual tratada, a qual excedeu, para este parâmetro, o valor máximo recomendado para água de rega. Em futuros estudos sobre esta temática será fundamental avaliar o potencial efeito da acumulação nos solos, a longo prazo, de elementos contaminantes.

Palavras-Chave: Rega com águas residuais tratadas, mosto, elementos contaminantes.

1 – INTRODUÇÃO

A crescente escassez de água de qualidade obriga a que as fontes hídricas sejam utilizadas de forma eficiente e economicamente sustentável, sendo fundamental encontrar fontes “não convencionais” deste recurso. A reutilização das águas residuais tratadas

¹ Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P. /INIA Dois Portos, 2565-191 Dois Portos, Portugal.

² UIQA** - Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Química Agrícola e Ambiental, Universidade Técnica de Lisboa. Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

* Autor para correspondência: Sofia Catarino. INIA Dois Portos; Quinta de Almoíña, 2565-191 Dois Portos, Portugal. Tel.: +351261712106. Fax: +351261712426. E-mail: sofia.catarino@inrb.pt; evn.sofia.catarino@mail.net4b.pt

** UIQA (Unidade de Investigação Química Ambiental) é financiada pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia).

para rega dos campos agrícolas, tem sido um dos meios utilizados por alguns países para preservação de água de melhor qualidade para fins domésticos e industriais. Apesar das incertezas e preocupações sobre o impacto do uso destas águas na agricultura, a sua utilização tem sido considerada positiva devido a sua contribuição em matéria orgânica e nutrientes para solos com baixa fertilidade, e aos benefícios económicos e ambientais que proporciona (AYERS E WESTCOT, 1994; JIMENEZ-CISNEROS, 1995; TOZE, 2006). Contudo, o uso inadequado desta fonte alternativa de água poderá trazer riscos para a saúde e para o ambiente relacionados, por exemplo, com a acumulação de metais pesados no solo (TOZE, 2006).

A rega das vinhas com águas residuais tratadas poderá influenciar a composição mineral das uvas e conseqüentemente dos mostos e vinhos, na medida em que os seus constituintes minerais maioritários provêm em grande parte da absorção radicular. Assim sendo, a monitorização de elementos contaminantes nestes mostos é de extrema importância devido à sua influência ao nível tecnológico, na qualidade organoléptica, segurança alimentar e implicações legais.

Os vinhos e mostos apresentam normalmente teores de Al inferiores a 2 mg/L (GALANI-NIKOLAKAKI *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2003; CATARINO *et al.*, 2006). CORREIA *et al.*, (2006) encontraram teores de Al entre 0,49 e 4,95 mg/Kg, em uvas (peso fresco). TEISSEDRE *et al.* (1998) relataram teores de Ni entre 4,2 a 94 µg/Kg, em uvas (peso fresco) e CATARINO *et al.* (2006) teores entre 13 e 17 µg/L, em mostos. Relativamente à presença de As em mostos e vinhos, CATARINO *et al.* (2006) referem teores inferiores a 8 µg/L (mostos), enquanto que TAYLOR *et al.* (2003) relataram teores inferiores a 20 µg/L. A água utilizada para a rega das vinhas é considerada como sendo a principal fonte contaminação de As (UNEYAMA *et al.*, 2007). A presença de Cd e Pb nos vinhos está fortemente associada à poluição industrial (RIBEIRO DE LIMA *et al.*, 2004; CATARINO *et al.*, 2008). KRISTL *et al.* (2002) quantificaram teores de Cd em uvas entre 0,2 e 0,4 µg/L. No entanto, teores superiores (na ordem dos 3 a 4 µg/kg em peso fresco) nas uvas foram doseados por RIBEIRO DE LIMA *et al.* (2004). Vários autores referem teores de Cd nos mostos inferiores a 5 µg/L (GALANI-NIKOLAKAKI *et al.*, 2002; KRISTL *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2003; CATARINO *et al.*, 2006). São referidos na literatura teores de Pb nos bagos de uvas na ordem de 1 a 25 µg/Kg (peso fresco) (KRISTL *et al.*, 2002; CORREIA *et al.*, 2006). CATARINO *et al.*, (2006) referem

teores de Pb em mostos e vinhos inferiores a 16 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A presença de Cr nas uvas é normalmente inferior a 100 $\mu\text{g/Kg}$ (peso fresco) (CABRERA-VIQUE *et al.*, 1997; KRISTL *et al.*, 2002), enquanto nos mostos e vinhos, foram relatados teores entre 0,5 a 2 $\mu\text{g/L}$ (KRISTL *et al.*, 2002) e 7 a 90 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (CABRERA-VIQUE *et al.*, 1997; KRISTL *et al.*, 2002). TOKALIOĞLU *et al.*, (2004) observaram teores de Fe na ordem dos 15 a 63 mg/Kg (peso seco) e teores de Cu inferiores a 6 mg/Kg (peso seco), respectivamente. Quanto aos teores destes metais nos mostos e vinhos, alguns autores referem teores de Fe normalmente inferiores a 5 mg/L (DOMINÉ, 2003; CATARINO *et al.*, 2006) e teores de Cu na ordem dos 0,3 a 20 mg/L (CATARINO *et al.*, 2006), sendo os vinhos detentores de teores de Fe na ordem dos 2 a 20 mg/L (CATARINO *et al.*, 2008) e de Cu na ordem dos 0,01 a 0,2 mg/L (GALANIKOLAKAKI *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2003; CATARINO *et al.*, 2006).

Actualmente, no âmbito da organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) encontram-se estabelecidos limites máximos admissíveis no vinho apenas para alguns elementos, entre os quais Cu (1 mg/L), As (0,2 mg/L), Cd (0,010 mg/L) e Pb (0,15 mg/L) (OIV, 2009).

O objectivo do presente trabalho consistiu em avaliar o efeito da rega da vinha com águas residuais tratadas numa ETAR (Estação de Tratamento de Águas Residuais), na composição mineral de mostos, monitorizando a presença de Al, Cr, Fe, Ni, Cu, As, Cd e Pb.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Mostos

Os mostos foram obtidos a partir de uvas de três castas (Aragonez, Syrah e Trincadeira) provenientes de uma vinha regada, gota a gota, com águas residuais após pré-tratamento numa ETAR municipal. As uvas foram colhidas no ano de 2006 e conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas. Foram ensaiadas duas modalidades de preparação de modo a avaliar a possível influência da poluição atmosférica na composição mineral dos mostos. Parte dos cachos foram sujeitos a uma lavagem (por imersão e lavagem individual de cada cacho com esguicho) com água ultrapura, sendo a restante parte não sujeita a qualquer lavagem. Os mostos foram obtidos por esmagamento manual dos bagos em sacos de plástico, sendo os mostos obtidos a partir dos cachos sujeitos a

lavagem designados por AL1 e AL2 (A - Aragonez), SL1 e SL2 (S - Syrah) e, TL1 e TL2 (T - Trincadeira). Por seu lado, os mostos obtidos a partir dos cachos de uvas que não tinham sido sujeitas a lavagem foram designados por A1, A2, S1, S2, T1 e T2. Para cada casta foram preparadas duas amostras de mosto, e para cada mosto preparou-se o respectivo duplicado, obtendo-se assim 24 amostras de mosto. Os mostos obtidos foram sujeitos a digestão húmida com 5% HNO_3 (v/v) à temperatura de 95°C, como descrito por NEVES (2009). Todo o processo de obtenção dos mostos apresenta-se esquematizado na Figura 1.

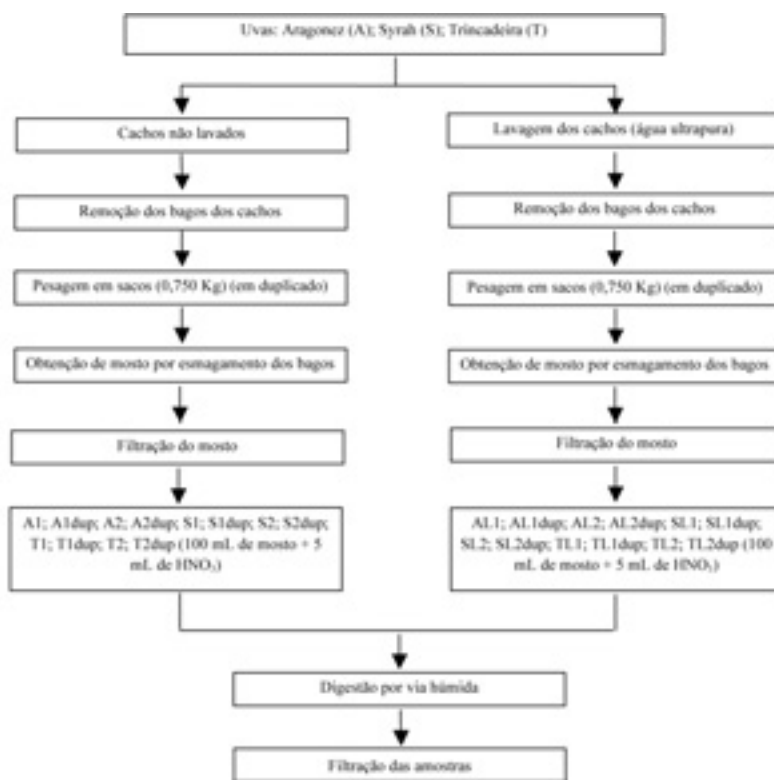


Figura 1 – Representação esquemática do processo de obtenção dos mostos

2.2 – Determinações analíticas

O doseamento de Fe foi realizado directamente no mosto, por Espectrofotometria de Absorção Atómica com Chama (*FAAS*), tendo sido utilizado o equipamento *AAnalyser 100 Perkin Elmer*, equipado com queimador de ar-acetileno e lâmpada de cátodo oco de ferro (*Perkin-Elmer*), segundo o método descrito pela Norma Portuguesa 2280 (NP-2280). Alumínio, Cu, Cd e Pb foram doseados por Espectrofotometria de Absorção com Atomização Electrotérmica (*ETAAS*), de acordo com os métodos descritos por CATARINO (2000) e CATARINO *et al.* (2002; 2005). Foi utilizado um espectrofotómetro *Perkin-Elmer*, modelo *4110 ZL*, equipado com efeito de Zeeman para correcção do ruído de fundo, autoamostrador AS-72 e lâmpadas de cátodo oco de alumínio, cobre, cádmio e chumbo (*Perkin Elmer Lumina™*). Os elementos anteriormente referidos foram analisados no Instituto Nacional de Recursos Biológicos/INIA – Dois Portos, no Laboratório de Análise Mineral. Os restantes elementos (Cr, Ni e As) foram igualmente determinados por *ETAAS*, utilizando o equipamento *GF95Z (Unicam)*, equipado com efeito de Zeeman para correcção do ruído de fundo e lâmpadas de cátodo oco de crómio, níquel e arsénio (*Unicam*). As condições operatórias encontram-se descritas (NEVES, 2009). Estes elementos foram analisados no Departamento de Química Agrícola e Ambiental do Instituto Superior de Agronomia em Lisboa. Os produtos e reagentes utilizados nas determinações analíticas anteriormente referidas encontram-se descritos (Neves, 2009).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores dos elementos contaminantes nos mostos, expressos em $\mu\text{g/L}$, são apresentados na Figura 2 (Al, Fe e Cu) e no Quadro 2 (Cr, Ni, As, Cd e Pb). No Quadro 3 são referidos os teores destes elementos na água de rega, os valores máximos recomendados e admissíveis estabelecidos pela Directriz da FAO (AYERS & WESTCOT, 1994) e pelo Decreto-Lei n.º 236/98 em água de rega. Alumínio, Fe e Cu foram quantificados na generalidade das amostras. Estes são também os elementos que na água residual tratada se encontravam acima dos valores máximos recomendados, embora abaixo dos valores máximos admissíveis.

Os mostos S1, S2, SL1, T1 e T2 apresentaram teores de Al ligeiramente superiores aos normalmente presentes nos mostos (inferiores a 2mg/L) (TAYLOR *et al.*, 2003; CATARINO *et al.*, 2006). As amostras de mosto obtidas a partir dos cachos de uvas lavados

antes do esmagamento apresentaram um menor teor de Al na sua composição (com excepção das amostras obtidas a partir das uvas da casta Aragonez). Estes resultados reforçam a ideia defendida por CORREIA *et al.* (2006) de que a principal fonte de contaminação das uvas, mostos e vinhos por este elemento tem origem exógena (contaminação atmosférica e uso de alguns produtos enológicos).

O teor de Fe presente nos mostos variou entre 0,8 a 3,4 mg/L. Estes teores são semelhantes aos encontrados por PUIG-DEU *et al.* (1994) e por CATARINO *et al.* (2006) em mostos. Apesar do teor de Fe encontrado na água de irrigação das vinhas (17 mg/L) ser muito superior ao valor máximo recomendado pelo Decreto-Lei e pela Directriz da FAO (5 mg/L), a sua concentração nos mostos é relativamente baixa e dentro dos valores referidos na bibliografia (< 5 mg/L) (DOMINÉ, 2003; CATARINO *et al.*, 2006). Tal como se verificou para o Al, as amostras provenientes dos cachos de uvas lavados (com excepção da casta Aragonez) apresentaram teores de Fe ligeiramente inferiores aos das modalidades sem lavagem, provavelmente porque se eliminou uma das fontes de contaminação dos mostos e vinhos por este elemento (as partículas de terra e poeiras que acompanham a uva).

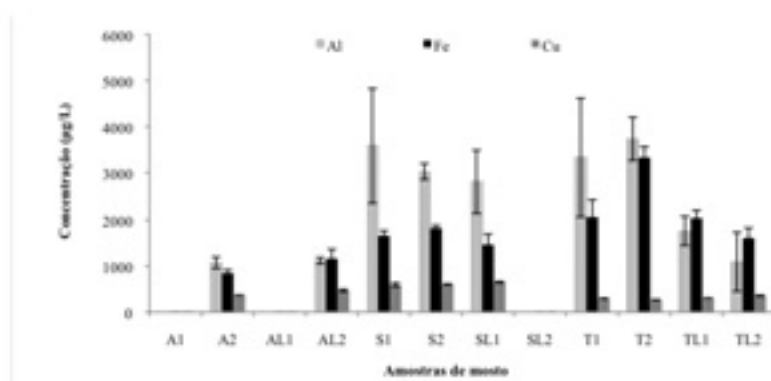


Figura 2 – Teores de Al, Fe e Cu nos mostos (µg/L)

Os mostos apresentaram teores de Cu na ordem dos 266 a 652 µg/L, dentro da gama de valores encontrados por outros investigadores (PUIG-DEU *et al.*, 1994; CA-

TARINO *et al.*, 2006), e distantes do limite máximo admissível em vinhos (1 mg/L) estabelecido pela OIV (2009). É de salientar que os mostos apresentaram teores muito baixos de Cr, Ni, As, Cd e Pb, na maioria das amostras abaixo do limite de quantificação do método. Aliás, os teores destes elementos na água de rega eram bastante inferiores aos respectivos valores máximos recomendados, revelando uma reduzida industrialização na zona de origem das águas residuais utilizadas.

| Mosto | Cr | Ni | As | Cd | Pb |
|-------|-----|------------|-----|-----|-----------|
| A1 | ..* | ..* | ..* | ..* | ..* |
| A2 | NQ | 10,6 ± 3,5 | NQ | ND | NQ |
| AL1 | ..* | ..* | ..* | ..* | ..* |
| AL2 | NQ | 6,9 ± 1,5 | NQ | ND | 8,1 ± 2,7 |
| S1 | NQ | NQ | NQ | ND | ND |
| S2 | NQ | NQ | NQ | ND | NQ |
| SL1 | NQ | NQ | NQ | ND | NQ |
| SL2 | ..* | ..* | ..* | ..* | ..* |
| T1 | NQ | NQ | NQ | ND | NQ |
| T2 | NQ | NQ | NQ | ND | 5,6 ± 0,2 |
| TL1 | NQ | 8,8 ± 3,3 | NQ | ND | ND |
| TL2 | NQ | NQ | NQ | ND | NQ |

NQ – Não quantificado (inferior a 1 µg/L, 3,5 µg/L, 10 µg/L, 0,18 µg/L, 3,6 µg/L, para Cr, Ni, As, Cd e Pb respectivamente)

ND – Não detectado (inferior a 0,05 µg/L e 2,2 µg/L, para Cd e Pb, respectivamente)

Os valores de concentração apresentados correspondem a média de 2 ensaios independentes (média ± desvio padrão)

* Média das concentrações não apresentadas em virtude de um dos ensaios ter sido acidentalmente inutilizado

Quadro 2 – Teores de Cr, Ni, As, Cd e Pb nos mostos (µg/L)

| Elemento contaminante | Concentração na água (mg/L) ¹ | VMR (mg/L) ² | VMA (mg/L) ³ |
|-----------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|
| Al | 10 | 5,0 | 20 |
| As | <0,03 | 0,10 | 10 |
| Cd | <0,02 | 0,01 | 0,05 |
| Pb | <0,5 | 5,0 | 20 |
| Cu | 0,56 | 0,20 | 5,0 |
| Cr | 0,02 | 0,10 | 20 |
| Fe | 17 | 5,0 | - |
| Ni | <0,05 | 0,5 ⁴ / 0,20 ⁵ | 2,0 |

¹ Determinações analíticas realizadas em laboratório externo

² VMR estabelecidos pelo Decreto-Lei n.º 236/98 relativamente a qualidade das águas destinadas à rega e pela Diretriz da FAO

³ VMR estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 236/98

⁴ VMR estabelecido pela Diretriz da FAO

⁵ VMA estabelecidos pelo Decreto-Lei n.º 236/98

Quadro 3 – Teores de elementos contaminantes na água residual, valores máximos recomendáveis (VMR) e admissíveis (VMA) em água de rega

Um aspecto extremamente importante a considerar (não contemplado nos objetivos deste trabalho) é o potencial efeito da acumulação destes elementos nos solos a longo prazo. É fundamental que mais estudos sejam realizados de modo a poder garantir a máxima segurança no uso das águas residuais tratadas para rega de vinhas a curto e longo prazo.

4 – CONCLUSÕES

Foram observados teores baixos de Cr, Fe, Ni, Cu, As, Cd e Pb nas diferentes amostras de mosto, o que indicia que não ocorreu contaminação considerável das uvas em resultado da rega da vinha com água residual tratada. Crómio, As e Cd não foram quantificados, por se encontrarem em teores inferiores aos limites de quantificação dos respectivos métodos, e, com poucas exceções, o mesmo se verificou para os elementos Ni e Pb. Os teores de Al encontrados em algumas amostras de mosto são ligeiramente superiores aos normalmente referidos na bibliografia. De salientar que a concentração deste elemento na água residual tratada excede o valor máximo recomendável para água de rega. As amostras provenientes de cachos de uvas com lavagem antes do esmagamento apresentaram teores mais baixos de Al e Fe, comparativamente com a modalidade não lavada. No caso de Al, isto poderá significar que parte da contaminação dos mostos por este elemento é de origem exógena. Relativamente a Fe, estes resultados reforçam a ideia de que as partículas de terra que acompanham a uva constituem uma das fontes de contaminação dos mostos e vinho.

A investigação da relação de causa-efeito entre o teor de elementos contaminantes na água de rega e o encontrado nos mostos e vinhos, e de forma paralela, do seu potencial efeito de acumulação nos solos a longo prazo, é bastante relevante para o aumento do conhecimento sobre esta temática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayers R.S., Westcot D.W., 1994. *Water quality for agriculture*. FAO Irrigation and Drainage Paper.
- Cabrera-Vique C., Teissedre P.L., Cabanis M.T., Cabanis J.C., 1997. Determination and levels of chromium in French wine and grapes by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1808-1811.
- Catarino S., 2000. *A ocorrência de chumbo e cádmio em vinhos*. Dissertação de Mestrado em Viticultura e Enologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Catarino S., Curvelo-Garcia A.S., Bruno de Sousa R., 2002. Determination of aluminium in wine by graphite furnace AAS: validation of analytical method. *Atomic Spectroscopy*, **23** (6), 196-200.
- Catarino S., Pimentel I., Curvelo-Garcia A.S., 2005. Determination of copper in wine by ETAAS using conventional and fast thermal programs: validation of analytical method. *Atomic Spectroscopy*, **26** (2), 73-78.
- Catarino S., Capelo J.L., Curvelo-Garcia A.S., Bruno de Sousa R., 2006. Evaluation of contaminant elements in Portuguese wines and original musts by high intensity focused ultrasound combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **40** (2), 91-100.
- Catarino S., Curvelo-Garcia A.S., Bruno de Sousa R., 2008. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **23** (1) 3-19.
- Correia L., Soares M.E., Bastos M.L., 2006. Validation of an electrothermal atomization atomic absorption spectrometry method for the determination of aluminum, copper, and lead in grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9312-9316.
- Dominé A., 2003. *Wine*. Könemann, Berlin.
- DR (1998). Decreto-Lei n.º 236/98, Diário da República – I Série-A, 1 de Agosto.
- Galani-Nikolakaki S., Kallithrakas-Kontos N., Katsanos A.A., 2002. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The Science of the Total Environment*, **285**, 155-163.
- Jimenez-Cisneros B., 1995. Wastewater reuse to increase soil productivity. *Journal of Water and Science Technology*, **32** (12), 173-180.
- Kristl J., Veber M., Slekovec M., 2002. The application of ETAAS to the determination of Cr, Pb, and Cd in samples taken during different stages of the winemaking process. *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, **373**, 200-204.

- Neves A.C.H.S., 2009. *Desenvolvimento e aplicação de métodos de análise por técnicas espectrométricas para controlo da qualidade do vinho*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- OIV, 2009. *Compendium of International Methods of Analysis of Wine and Musts*. Volume 2. International Organization of Vine and Wine, Paris.
- Puig-Deu M., Lamuela-Raventós R., Buxaderas S., Torre-Boronat C., 1994. Determination of copper and iron in must: comparison of wet and dry ashing. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45** (1), 25-28.
- Ribeiro de Lima M.T., Cabanis M.T., Matos L., Cassanas G., Kelly M.T., Blaise A., 2004. Determination of lead and cadmium in vineyard soils, grapes and wines of the Azores. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **38** (3), 163-170.
- Taylor V. T., Longerich H. P., Greenough J. D., 2003. Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 856-860.
- Teissedre P.L., Cabrera-Vique C., Cabanis M.T., Cabanis J.C., 1998. Determination of nickel in French wines and grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **49** (2), 205-210.
- Tokalioğlu Ş., Kartal Ş., Güneş A.A., 2004. Statistical evaluation of bioavailability of metals to grapes growing in contaminated vineyard soils using single extractants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **84** (9), 691-705.
- Toze S., 2006. Reuse of effluent water – benefits and risks. *Agricultural Water Management*, **80**, 147-159.
- Uneyama C., Toda M., Yamamoto M., Morikawa K., 2007. Arsenic in various foods: Cumulative data. *Food Additives and Contaminants*, **24** (5), 447-534.

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA VIDEIRA PELO SISTEMA INTEGRADO DE DIAGNÓSTICO E RECOMENDAÇÃO (DRIS)

Anabela CARNEIRO ^{(1), (2)}; Mário CUNHA ^{(1), (3)}; Óscar PEREIRA ^{(4), (5)}; Jorge QUEIROZ ^{(1), (2)}

RESUMO

O Sistema Integrado de Diagnóstico e de Recomendação (Diagnosis and Recommendation Integrated System - DRIS) constitui uma ferramenta alternativa para a avaliação do estado nutricional e a fundamentação da recomendação de fertilização de diversas culturas. Neste trabalho, pretendeu-se estabelecer normas DRIS para a cultura da vinha nas regiões de Portugal com maior relevância vitivinícola. Em 2007 e 2008 recolheram-se amostras de folhas de videira e calcularam-se os respectivos Índices DRIS. Os resultados revelaram a existência de desequilíbrios nutricionais nas amostras estudadas, com particular incidência nas vinhas com menores produções. Estas observações sugerem a necessidade de estabelecimento de padrões nutricionais baseados em dados representativos da variabilidade edafoclimática e varietal das regiões vitivinícolas.

PALAVRAS-CHAVE Vinha, Nutrição, DRIS

1 – INTRODUÇÃO

O diagnóstico foliar é uma ferramenta de avaliação indirecta da fertilidade do solo uma vez que há uma correlação directa entre a disponibilidade de nutrientes do solo e o teor dos mesmos nas folhas das plantas cultivadas (HARGER *et al.*, 2003).

¹ Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal; acarneiro@fc.up.pt.

² GRESA, Laboratório Associado REQUIMTE, Universidade do Porto.

³ Centro de Investigação em Ciências Geo-espaciais, Universidade do Porto.

⁴ DRAPNorte, Quinta de Sergude – Sendim, 4610 - 764 Felgueiras.

⁵ EOR, Laboratório de Análises Químicas, Lda. Av. Bombeiros Voluntários, n. 250, 1º-D, 4580-053 Paredes.

Actualmente, um dos métodos comumente usado é o “Critério de Faixas de Suficiência”. Este baseia-se na comparação de resultados foliares com valores de concentrações de nutrientes obtidas em épocas predeterminadas e em estados fisiológicos definidos. Como tal, sempre que um nutriente não se enquadra nos intervalos referidos, é considerado um factor limitante de crescimento, de produtividade ou de qualidade dos frutos. Por outro lado, a rigidez da época de colheita, torna impraticável a fertilização da cultura no próprio ano em que é realizada a análise.

De entre os métodos existentes para o diagnóstico nutricional das plantas, o “Diagnosis and Recommendation Integrated System” – DRIS, tem vindo a ser implementado em vários países (PARTELLI *et al.*, 2006; HARGER *et al.*, 2003; RUÍZ-BELLO & CAJUSTE, 2002; WADT *et al.*, 1999). Proposto por BEAUFILS em 1973, o DRIS tem por objectivos o complemento e auxílio das técnicas de avaliação do estado nutricional já existentes na identificação dos nutrientes que possam estar a limitar a produtividade, a par da fundamentação da recomendação de fertilização de diversas culturas em diferentes modos de produção.

O método DRIS assenta no cálculo de índices para cada nutriente considerando a sua relação com os restantes e na sua posterior comparação com as relações médias observadas em plantas consideradas de referência (padrões de produtividade) (MAEDA *et al.*, 2004; BATAGLIA *et al.*, 2004; RUÍZ-BELLO & CAJUSTE, 2002). O equilíbrio nutricional de cada nutriente na planta é dado por um índice DRIS que deverá ser próximo de zero (MOURÃO FILHO, 2005; OLIVEIRA & TAKAMATSU, 2004; WADT *et al.*, 1999). Se negativo, assume-se que ocorre deficiência do nutriente em relação aos demais e, quando positivo, significa que se encontra em excesso na planta (MOURÃO FILHO, 2005; OLIVEIRA & TAKAMATSU, 2004; WADT *et al.*, 1999). Tal classificação permite escalonar os nutrientes segundo a ordem de importância de limitação na produção, bem como estabelecer um nível intensidade de exigência de um nutriente pela planta (PARTELLI *et al.*, 2006; MOURÃO FILHO, 2005; WADT *et al.*, 1999;). Por último, o método DRIS calcula o índice de balanço nutricional (isto é, a soma em módulo de todos os índices dos nutrientes), o qual permite avaliar o equilíbrio nutricional da planta (MOURÃO FILHO, 2005; SILVA *et al.*, 2003; TOMÉ JR., s.d.). Assim, de acordo com os pressupostos da metodologia DRIS, o índice de balanço nutricional (IBN) será tanto mais próximo de zero, quanto mais equilibrado for o nível nutricional da planta.

(PARTELLI *et al.*, 2006; TOMÉ JR., s.d.). Convém salvaguardar que, caso o IBN se encontre próximo de zero e a produtividade ainda assim for baixa, tal facto pode dever-se a problemas não nutricionais tais como factores genéticos, práticas culturais desajustadas ou ocorrências meteorológicas desfavoráveis (RODRÍGUEZ & RODRÍGUEZ, 2000; TOMÉ JR., s.d.). Um outro aspecto a ter em conta é de que os valores de referência do DRIS não podem ser considerados como de aplicação universal mesmo quando obtidos em condições de ampla variabilidade ambiental. Actualmente é sabido que tais índices reflectem o efeito de factores edafoclimáticos regionais, resultando em diagnósticos erróneos quando os mesmos são adquiridos em condições distintas daquelas da amostra sob diagnóstico (MAEDA *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ & RODRÍGUEZ, 2000)

Por conseguinte, quando comparado com o Critério de Faixas de Suficiência, o DRIS, permitiu reduzir as variações decorrentes da época de colheita e da idade da planta amostrada, assim como o efeito das concentrações ou diluições nos teores de nutrientes relativas à produção de biomassa (WADT *et al.*, 1999; TOMÉ JR., s.d.). Por esta razão, atendendo a que é possível a colheita de amostras em diferentes estádios de crescimento da cultura, a utilização do DRIS torna praticável a realização de correcções no mesmo ano agrícola (HARGER *et al.* 2003; RODRÍGUEZ & RODRÍGUEZ, 2000). Como limitações refira-se o aparecimento de falsos diagnósticos em função das distorções provocadas por factores não controlados e pelo facto de trabalhar com índices o que implica que sempre que um nutriente está em deficiência, por questão de cálculo, outro estará em excesso, o que poderá não ser verdadeiro (BATAGLIA *et al.*, 2004).

2 – METODOLOGIA

Durante as campanhas agrícolas de 2006/07 e de 2007/08, em colaboração com as associações^(a) AANT, AAPIM, AATM, AFUVOPA, APPITAD, ATEVA, SOC. VINHOS BORGES, seleccionaram-se 93 parcelas de vinha, distribuídas pelas regiões do Norte, do Centro e do Alentejo. Estas foram divididas em dois grupos:

População A: caracterizada por apresentar produções elevadas ou muito elevadas (cujo valor de produtividade seria maior ou igual ao valor definido como médio de produção encontrado entre as vinhas amostradas e considerado alto para a cultura em determinada região) e;

População B: caracterizada como apresentando produções baixas ou muito baixas, quer em quantidade, quer em qualidade (cujo valor de produtividade seria inferior ao anteriormente estabelecido)

Após caracterização das parcelas, procedeu-se à colheita e às determinações analíticas das amostras de terras, folhas, águas de rega e frutos segundo as normas de Produção Integrada. Nas análises de terras avaliou-se a classe de textura, a matéria orgânica oxidável, o P e o K extraíveis, o valor de pH das suspensões 1: 2,5 em H₂O e KCl 1M e o Ca²⁺, o Mg²⁺, o K⁺ e o Na⁺ de troca. No material vegetal determinaram-se os parâmetros N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Mn e Fe. Nas águas de rega efectuaram-se as seguintes determinações: pH, condutividade, cálcio, magnésio, sódio, boro, cloretos, bicarbonatos, sulfatos, sólidos em suspensão, ferro, manganês, nitratos, índice de saturação e Razão de Adsorção de Sódio ajustada. A qualidade das uvas foi avaliada de acordo com os seguintes parâmetros: peso de 100 bagos, índice refractométrico (° Brix), acidez total (gramas de ácido tartárico/litro de sumo) e pH.

Partindo dos resultados analíticos obtidos, foi possível estabelecer os índices DRIS para cada uma das populações definidas, tendo como base as parcelas de vinha estudadas. Estes foram obtidos segundo: i) três fórmulas de cálculo das funções das razões dos nutrientes (Beaufils, Elwali & Gascho e Jones), ii) um critério para a escolha da razão dos nutrientes (Valor F) e iii) um para o somatório das funções (DRIS). O valor médio de produção considerado, que estabelece a divisão entre vinhas altamente produtivas e de baixa produtividade, foi definido conjuntamente com as Associações que colaboraram no Projecto, como sendo de 5 ton/ha.

Para proceder aos cálculos matemáticos do método DRIS e otimizar a informação recolhida, recorreu-se a um programa informático original (trabalha em ambiente Microsoft Windows® e permite a importação de dados desde o Microsoft Excel®) desenvolvido no âmbito do Projecto Fertisoft (Programa IDEIA da ADI – Agência de Inovação).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 apresenta-se o output do programa informático referente aos índices DRIS de uma vinha de alta produção.

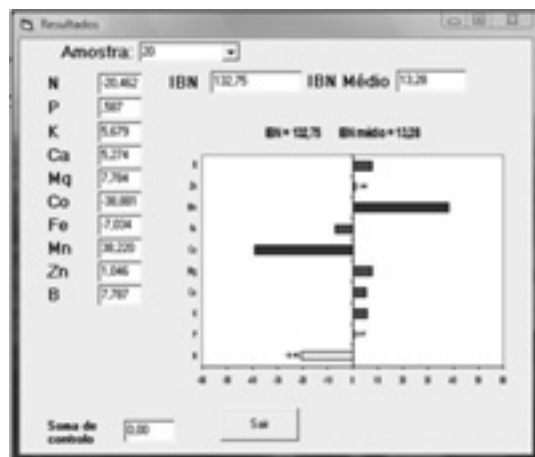


Figura 1 – Exemplo de output do programa informático para o cálculo dos índices DRIS, referente a uma amostra de Vinha de Alta Produção segundo o Método Beaufils (1973).

Pela análise da figura conclui-se que o cobre (Índice DRIS de -38,9) e o Azoto (Índice DRIS de -20,5) são os nutrientes com níveis mais baixos enquanto que o Manganês (cujo Índice DRIS é 38,2) se encontra claramente em excesso. Os índices dos restantes nutrientes situam-se dentro do intervalo de valores adequados.

Na Tabela seguinte apresentam-se as médias do Índice de Balanço Nutricional das populações observadas.

Tabela 1 – Média do Índice de Balanço Nutricional das populações de Baixa Produtividade – BP e de Alta Produtividade – AP.

| Método DRIS | BP | AP |
|------------------------|-------|-------|
| Beaufils (1973) | 216,6 | 142,9 |
| Elwali & Gascho (1984) | 124,4 | 62,3 |
| Jones (1981) | 151,8 | 148,0 |

Partindo do pressuposto de que um IBN diferente de zero significa que a amostra se encontra nutricionalmente desequilibrada, podemos constatar que as vinhas estudadas apresentam graves desequilíbrios no que respeita à nutrição. É também notória a correlação negativa do IBN com a produtividade. Esta observação é suportada pelo facto de

a população menos produtiva apresentar, independentemente do método de cálculo, um valor de IBN superior à população de alta produtividade, sugerindo que, apesar do desequilíbrio nutricional evidente de todas as vinhas estudadas, estes indicadores acentuam-se nas vinhas com menores produtividades.. Contatam-se ainda as diferenças entre os métodos apresentados.

De seguida expõem-se, a título exemplificativo, os Índices DRIS para uma amostra de Baixa Produção e para outra de Alta Produção (Tabela 2).

Tabela 2 – Índices DRIS de uma amostra de Baixa Produtividade e de outra de Alta Produtividade

| Método | Índices DRIS para os diferentes nutrientes | | | | | | | | | | IBN* |
|----------------------------|--|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| | N | P | K | Ca | Mg | Cu | Fe | Mn | Zn | B | |
| <i>Baixa Produtividade</i> | | | | | | | | | | | |
| Beaufils (1973) | -10,6 | -3,5 | -9,1 | -3,0 | -6,1 | -27,1 | 73,9 | 41,7 | -64,7 | 8,4 | 248,0 |
| Elwali & Gascho (1984) | -5,9 | 6,6 | 4,4 | 6,0 | -6,0 | -14,5 | 52,8 | 0,0 | -43,3 | 0,0 | 139,4 |
| Jones (1981) | -1,0 | 16,3 | -1,0 | 8,2 | -1,1 | -13,5 | 28,8 | 12,6 | -59,0 | 9,7 | 151,4 |
| <i>Alta Produtividade</i> | | | | | | | | | | | |
| Beaufils (1973) | 7,0 | -2,7 | 12,4 | -3,6 | -3,3 | -1,7 | 2,3 | -5,4 | -3,5 | -1,6 | 43,3 |
| Elwali & Gascho (1984) | 0,0 | 0,0 | 8,9 | -1,2 | 0,0 | -0,8 | 0,0 | -4,8 | -2,2 | 0,0 | 17,9 |
| Jones (1981) | 16,1 | -5,1 | 25,8 | -9,4 | -5,3 | -4,1 | 4,1 | -10,0 | -8,2 | -3,8 | 91,8 |

*IBN – Índice de Balanço Nutricional

Nesta tabela, está de novo patente o facto de que os Índices DRIS variam consoante os métodos utilizados. Comprova-se igualmente que as vinhas pouco produtivas são aquelas que apresentam um IBN mais elevado, o que se traduz num maior desequilíbrio nutricional. Os valores dos Índices DRIS de cada nutriente, tornam possível o estabelecimento da seguinte ordem de limitação nutricional (Tabela 3).

Tabela 3 – Ordem de limitação nutricional para as duas amostras consideradas.

| Método | <i>Baixa Produtividade</i> | <i>Alta Produtividade</i> |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Beaufils (1973) | Zn>Cu>N>K>Mg>P>Ca>B>Mn>Fe | Mn>Ca>Zn>Mg>P>Cu>B>Fe>N>K |
| Elwali & Gascho (1984) | Zn>Cu>Mg>N>Mn>B>K>Ca>P>Fe | Mn>Zn>Ca>Cu>N>P>Mg>Fe>B>K |
| Jones (1981) | Zn>Cu>Mg>N>K>Ca>B>Mn>P>Fe | Mn>Ca>Zn>Mg>P>Cu>B>Fe>N>K |

A ordem de limitação nutricional, à semelhança dos valores dos índices DRIS sofre ligeiras variações consoante o método. Contudo, apesar das flutuações, há um padrão semelhante nos resultados obtidos. De mencionar que, para o caso da amostra pouco produtiva, independentemente do método, o Zinco e o Cobre são sempre os micronutrientes mais negativos sendo o Ferro o mais excessivo. Na situação da vinha de alta produção, a leitura dos dados processa-se da mesma forma.

Refira-se que, embora se tenham também recolhido amostra de terras, de águas de rega e de uvas para análise, optou-se por não apresentar os referidos resultados dadas as limitações de espaço.

4 – CONCLUSÃO

Pela análise dos dados obtidos, constata-se que o real valor das normas DRIS é ainda pouco perceptível. Até à data, não se dispõe de informações suficientes que permitam determinar qual será o método mais adequando à avaliação nutricional das vinhas portuguesas. Todavia, realçam-se os graves desequilíbrios nutricionais de todas as vinhas analisadas, incluindo as vinhas altamente produtivas, o que explica a adopção de um valor de 5 ton/ha como produção média. Os resultados sugerem também a necessidade de estabelecimento de padrões nutricionais para a vinha baseados em dados representativos da variabilidade edafoclimática e varietal das regiões agrícolas portuguesas. Para uma mais ampla divulgação e validação do sistema DRIS como instrumento de recomendação de fertilização de solos para a vinha será útil aumentar o número de observações para permitir analisar outros factores para além da produtividade, como a independência da época de amostragem, e quantificar os ganhos ambientais e económicos inerentes ao método DRIS.

^(a) AANT – Associação dos Agricultores do Nordeste Transmontano; AAPIM – Associação de Agricultores para a Produção Integrada de Frutos de Montanha; AATM – Associação de Agricultores de Trás-os-Montes; AFUVOPA – Associação dos Fruticultores, Viticultores e Olivicultores do Planalto de Ansiães; APPITAD – Associação de Produtores em Protecção Integrada de Trás-os-Montes e Alto Douro; ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo; SOC. VINHOS BORGES – Sociedade dos Vinhos Borges.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATAGLIA, O. C.; QUAGGIO, J. A.; SANTOS, W. R.; ABREU, M. F. (2004). Diagnose Nutricional do cafeeiro pelo DRIS variando-se a constante de sensibilidade dos nutrientes de acordo com a intensidade e frequência de resposta na produção. *Bragantia*, Campinas, 63 (2), 253–263.
- HARGER, N.; FIORETTO, R.; RALISCH, R. (2003). Avaliação nutricional da cultura da soja pelos métodos DRIS e níveis de suficiência. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 24 (2), 219–224.
- MAEDA, S.; RONZELLI JÚNIOR, P.; LUCCHESI, L. A. C. (2004). Valores de referência do DRIS para a soja, cv. cd 202, para a região sul do Mato Grosso do Sul. *Scientia Agrária*, 5 (1-2), 35 – 42.
- MOURÃO FILHO, F. A. A. (2005). DRIS and sufficient range approaches in nutritional diagnosis of “Valência” sweet orange on three rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 691 – 705.
- OLIVEIRA, R. F.; TAKAMATSU, J. A. (2004). Uso do DRIS para avaliação do estado nutricional da pimenteira-do-reino, em Tomé-Açu, PA. Comunicado técnico 94. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Belém, 1–4.
- PARTELLI, F. L.; VIEIRA, H. D.; MONNERAT, P. H. ; VIANA, A. P. (2006). Comparação de dois métodos DRIS para o diagnóstico de deficiências nutricionais do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41 (2), 301–306.
- RODRÍGUEZ, O.; RODRÍGUEZ, V. (2000). Desarrollo, determinación e interpretación de normas DRIS para el diagnóstico nutricional en plantas. Una revisión. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Barquisimetro, 17, 449–470.

- RUÍZ-BELLO, A.; CAJUSTE, L. J. (2002). Controlling fertilizer applications through plant analysis. *Communications in soil science and plant analysis*, 33 (15–18), 2793–2802.
- SILVA, E. B.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G. (2003). Secção IV – Fertilidade do solo e nutrição de plantas, Uso do DRIS na avaliação do estado nutricional do cafeeiro em resposta à adubação potássica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, 27, 247–255.
- TEIXEIRA, L. A. J.; SANTOS, W. R. ; BATAGLIA, O. C. (2002). Diagnose nutricional para nitrogênio e potássio em bananeira por meio do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) e de níveis críticos. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 24 (2), 530–535.
- TOMÉ JR., J. B. (s.d). DRIS da Compo Do Brasil: CliqFolha© programa para diagnóstico nutricional das culturas pelo DRIS.
- WADT, P. G. S.; NOVAIS, R. F.; VENEGAS, V. H. A.; BRAGANÇA, S. (1999). Alternativas de aplicação do “DRIS” à cultura de Café Conilon (*Coffea canephora* Pierre). *Scientia Agricola*, São Paulo, 56 (1), 1-15.

