

9º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO

15-16-17 MAIO

ÉVORA - PORTUGAL

2013

LIVRO DE ATAS
VOLUME 1



9º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO

15 – 16 – 17 DE MAIO 2013

Organizado por

ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

CVRA – Comissão Vitivinícola Regional Alentejana

CCDRA – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento da Região Alentejo

DRAPAL – Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

UE – Universidade de Évora

Com o apoio de:



VOLUME 1

ACTAS

Comissão Executiva

ATEVA – Francisco Mata

CVRA – Dora Simões

CCDRA – Francisco Sabino

DRAPAL – Eduarda Pontes da Silva

UE – João Mota Barroso

Conselho Científico:

Engenheira Miriam Cavaco - 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

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 José Veríssimo – Instituto Superior de Economia e Gestão

Professora Maria João Cabrita - Universidade de Evora

Professor Carlos Lopes - Instituto Superior de Agronomia

SESSÃO I

Sessão de Abertura Presidida por Sua Ex^a o Secretário de Estado do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Eng^o José Diogo Santiago de Albuquerque

Alocações de Boas Vindas e de Introdução ao Simpósio pelas Entidades Organizadoras

Dr. António Dieb – 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

Material Vegetal

Presidente da sessão – Prof. Rogério de Castro (ISA Lisboa)

CONFERÊNCIA I

Conservação da variabilidade Genética

Moderador – Prof. Rogério de Castro (ISA Lisboa)

Oradores – Prof. Antero Martins

SESSÃO III

Discussão de Posters

CONFERÊNCIA II

Terroirs da Península Ibérica

Moderador – Prof. Jorge de Queiroz (Faculdade de Ciências do Porto)

Orador – Prof. Vicente Gómez-Miguel

SESSÃO IV

Enologia

Presidente da sessão – Prof^a Olga Laureano (ISA Lisboa)

CONFERÊNCIA III

Use of Oak extract as grape biostimulant to enhance the wine quality

Modarador – Prof^a Olga Laureano (ISA Lisboa)

Oradora – Prof^a M. Rosario Salinas

SESSÃO V

Microbiologia

Presidente da sessão – Dr. António Curvelo Garcia – (EVN)

CONFERÊNCIA IV

A proteção integrada da vinha em Portugal e a Diretiva do uso sustentável dos pesticidas

Moderador – Dr. António Curvelo Garcia – (EVN)

Oradores – Prof. Pedro Amaro

SESSÃO VI

Tecnologia de Cultura e Rega

Presidente da sessão – Prof. Carlos Lopes (ISA Lisboa)

CONFERENCIA V

Relações entre a composição química do vinho e as preferências dos consumidores asiáticos e ocidentais

Presidente da sessão – Dr^a Dora Simões (CVRA Évora)

Oradores – Dr. Leigh Francis

SESSÃO VII

Condução e Zonagem

Presidente da sessão – Prof. João Mota Barroso (UE Évora)

CONFERÊNCIA VI

Comunicar é mais que palavras: o poder da linguagem corporal

Moderador – Prof. João Mota Barroso (UE Évora)

Oradores – Dr^a Begona Suàrez

SESSÃO VIII

Proteção Fitossanitária

Presidente da sessão – Dr. António Mexia (ISA Lisboa)

SESSÃO IX

Mercado e Análise Sensorial

Presidente da sessão – Prof^a M. João Cabrita (UE Évora)

CONFERÊNCIA VII

Um brinde para não envelhecer

Moderadora – Prof^a M. João Cabrita (UE Évora)

Oradores – Dr. Tiago Fleming Outeiro

SESSÃO DE ENCERRAMENTO

Presidida por Sua Ex^a a Ministra da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Prof^a Dr^a Maria da Assunção de Oliveira Cristas Machado da Graça

Alocações de encerramento

Eng^o Francisco Murteira – Diretor Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

Eng^o Frederico Falcão – Presidente do Instituto da Vinha e do Vinho

Prof. João Mota Barroso – Presidente da Direcção da Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

INDICE

Corinne ROMAND; Emilie CARROUCHÉ; Olivier ZEKRI PRESENT & COMING DIAGNOSTIC TOOLS FOR GRAPEVINE PATHOGENS DETECTION: THE MERCIER NOVATECH EXPERIENCE	15
Elsa GONÇALVES; Antero MARTINS METODOLOGIAS DE ESTUDO DA INTERACÇÃO GENÓTIPO×AMBIENTE NA FASE FINAL DA SELECÇÃO CLONAL DA VIDEIRA	23
Jorge CUNHA; Javier IBÁÑEZ; Margarida TEIXEIRA-SANTOS; João BRAZÃO; Pedro FEVEREIRO; José Miguel MARTINEZ-ZAPATER e José E. EIRAS-DIAS A IMPORTÂNCIA DA CASTA ‘ALFROCHEIRO’ NA ORIGEM DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA VIDEIRA EM PORTUGAL	35
Jorge CUNHA; Margarida TEIXEIRA-SANTOS; João BRAZÃO e José E. EIRAS-DIAS COLEÇÃO AMPLIOGRÁFICA NACIONAL: PRESERVAÇÃO DO PATRIMÓNIO VARIETAL DE <i>VITIS VINIFERA</i> (POSTER)	45
Elisa COSTA; João FERREIRA DA SILVA; Fernanda COSME; António M. JORDÃO COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE CASTAS TINTAS NACIONAIS E ESTRANGEIRAS CULTIVADAS EM DUAS REGIÕES VITIVINICOLAS PORTUGUESAS (DOURO E DÃO)	51
Maria João CABRITA; Raquel GARCIA; Ana Elisa RATO; Ana Cristina AGULHEIRO SANTOS AVALIAÇÃO DA TEXTURA DE UVAS DE DIFERENTES VARIEDADES	61
Ana Cristina ROMÃO; Jorge RICARDO-DA-SILVA; Olga LAUREANO EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE VINHOS CV TOURIGA NACIONAL E TRINCADEIRA DE COLAGEM COM PROTEÍNAS VEGETAIS	71
<u>Mickael C. SANTOS</u> , Cláudia NUNES, Ana RODRIGUES, Sílvia M. ROCHA, Jorge A. SARAIVA, Manuel A. COIMBRA POTENCIAL ENVELHECIMENTO DE VINHOS POR TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	83

Madalena SIMOES; Sofia CATARINO; Maria João CABRITA A ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA DE VINHOS (POSTER)	93
Cláudia LOPES; Raquel GARCIA; Maria João CABRITA A MACROOXIGENAÇÃO CONTROLADA EM MOSTOS BRANCOS: UM CASO PRÁTICO (POSTER)	101
António M. JORDÃO; Fernando J. GONÇALVES; Ana C. CORREIA; Ari De MARI AVALIAÇÃO DOS TEORES EM TANINOS ELÁGICOS E DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES TIPOS DE APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO (POSTER)	111
Bruno SOARES, Sofia VALDANTAS, Raquel GARCIA, Maria João CABRITA CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE DIFERENTES MADEIRAS: INFLUÊNCIA DO GRAU DE TOSTA E DA ESPÉCIE BOTÂNICA (POSTER)	121
Bruno SOARES, Nuno MARTINS, Raquel GARCIA, Marco GOMES da SILVA, Maria Joao CABRITA A COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS COM INTERESSE ENOLÓGICO (POSTER)	131
Sílvia TEIXEIRA; Fernando M. NUNES; Sofia FRADIQUE; Fernanda COSME; Alice VILELA CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E FENÓLICA DE VINHOS BRANCOS MONOVARIETAIS DA REGIÃO DEMARCADA DO DOURO (POSTER)	141
Ana I. PARDO-GARCÍA; Kortes SERRANO DE LA HOZ; Ana M. MARTÍNEZ-GIL; Amaya ZALACAIN; Gonzalo L. ALONSO; M. Rosario SALINAS EFFECTO DE TRATAMIENTOS FOLIARES DE EUGENOL, GUAYACOL Y WHISKYLACTONAS SOBRE LOS PRECURSORES AROMÁTICOS GLICOSÍDICOS DE LAS UVAS Y SUS VINOS (POSTER)	151
Ema CALÇADA, <u>Fernanda COSME</u> e Ana BARROS DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS MONOVARIETAIS DAS CASTAS TOURIGA NACIONAL E ARAGONÊS PELO PERFIL ANTOCIÂNICO (POSTER)	161
Tânia RIBEIRO; Conceição FERNANDES; Fernando M. NUNES ; Luís FILIPE-RIBEIRO; <u>Fernanda COSME</u>	

ESTABILIZAÇÃO PROTEICA DE VINHOS BRANCOS POR ADIÇÃO DE MANOPROTEÍNAS E IMPACTO NA QUALIDADE (POSTER)	171
Susete RODRIGUES, Luís FILIPE-RIBEIRO, Fernando M. NUNES, <u>Fernanda COSME</u> DESOXIGENAÇÃO APÓS TRANSPORTE: IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DO VINHO LOUREIRO (POSTER)	179
Raquel GUISE; Luís FILIPE-RIBEIRO; Diana NASCIMENTO; Olga BESSA; Fernando M. NUNES; <u>Fernanda COSME</u> UTILIZAÇÃO DA CARBOXIMETILCELULOSE PARA A ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA DE VINHOS BRANCOS (POSTER)	191
<u>Fernando J. GONÇALVES</u> ; Sílvia M. ROCHA; Manuel A. COIMBRA CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DESALCOOLIZADO RESULTANTE DA DESTILAÇÃO VÍNICA (POSTER)	201
Paula BRAGANÇA; Óscar GATO; Olga LAUREANO, Jorge RICARDO DA SILVA FERMENTAÇÃO E ESTÁGIO DE VINHO ROSÉ EM MADEIRA. AVALIAÇÃO DAS SUAS POTENCIALIDADES (POSTER)	209
Kortes SERRANO DE LA HOZ; Ana I. PARDO-GARCÍA; Manuel CARMONA; Amaya ZALACAIN; Gonzalo L. ALONSO; M. Rosario SALINAS EVALUACIÓN DEL POTENCIAL AROMÁTICO GLICOSÍDICO DE VIÑAS TRATADAS CON EXTRACTO DE ROBLE. INFLUENCIA EN EL AROMA DEL VINO (POSTER)	219
Diogo PINHO; Cátia PINTO; Susana SOUSA; Miguel PINHEIRO e Ana Catarina GOMES MICROBIOMA DAS UVAS E FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE DIFERENTES REGIÕES VITIVÍNICOLAS PORTUGUESAS	229
Susana SOUSA e Ana Catarina GOMES ENOKIT: SISTEMA MOLECULAR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NO VINHO	239
Manuel RAMÍREZ; Matilde MAQUEDA, Alexis GILLET, Bruno MARCHESI, Rocío VELÁZQUEZ, José A. REGODÓN PRODUCCIÓN DE LEVADURAS NO-<i>Saccharomyces</i> PARA VINIFICACIÓN	249

- M^a Jesús JIMÉNEZ ; Zulema PIÑEIRO ; M^a Esther RODRÍGUEZ ; Emma CANTOS ; Carmen CASTEJÓN ; Jesús CANTORAL ; Belén PUERTAS
INFLUENCIA DE LA MACERACIÓN PELICULAR Y DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL DE LEVADURAS EN VINOS BLANCOS 259
- Ana Raquel SANTOS; André PARDAL; Daniel DUARTE; Leonor NOVAIS; Fernando DELGADO, José EIRAS-DIAS, Isabel ANDRADE, António CUNHA and Ana Catarina GOMES
COMBINAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES E SISTEMAS DE INFORMAÇÃO PARA IDENTIFICAR INEQUIVOCAMENTE CULTIVARES DE *VITIS VINIFERA* 273
- Mahesh CHANDRA; André BARATA; Suzana FERREIRA-DIAS; Manuel MALFEITO-FERREIRA and Virgilio LOUREIRO
THE EFFECT OF WINE COMPOSITION ON *DEKKERA BRUXELLENSIS* GROWTH AND VOLATILE PHENOL PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY APPROACH (POSTER) 283
- María CARBÚ; Victoria Eugenia GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ; Carlos GARRIDO; and Jesús Manuel CANTORAL
***AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MEDIATED TRANSFORMATION OF GRAPE FUNGAL PATHOGENS AS A TOOL TO STUDY THE MECHANISMS OF PATHOGENICITY (POSTER)** 291
- Cátia PINTO; Valéria CUSTÓDIO; Susana SOUSA e Ana Catarina GOMES
ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE PRESENTE NO MICROBIOMA DA VINHA (POSTER) 297
- M.C. BERNAL; E. MUÑOZ-BERNAL; M.E. RODRÍGUEZ; F.J. FERNÁNDEZ-ACERO; J.M. CANTORAL
HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS A LA MEJORA DE LOS VINOS TINTO (POSTER) 305
- F. J. FERNÁNDEZ-ACERO; E. LIÑEIRO; J. M. CANTORAL
BOTRYTIS CINEREA PROTEOME STUDIES (POSTER) 315
- Manuel RAMÍREZ; Rocío VELÁZQUEZ, Alexis GILLET, Estelle PEYRASSE, Emiliano ZAMORA, Pedro COTILLA, María Luz ÁLVAREZ

CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS LEVADURAS PARA LA ELABORACIÓN DE CAVA (POSTER)	323
José María HERAS ; Fernando PEDROSA ; Nuno ALVES AVANCES EN CONTROL BIOLÓGICO DURANTE LA ELABORACIÓN DE VINO (POSTER)	333
Pedro AMARO A PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA EM PORTUGAL E A DIRECTIVA DO USO SUSTENTÁVEL DOS PESTICIDAS	343
Pedro AMARO A EVOLUÇÃO DOS PESTICIDAS E DA ÁREA EM PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA EM PORTUGAL	363
Pedro AMARO A SELECÇÃO DOS PESTICIDAS E OUTRAS MEDIDAS SÃO FUNDAMENTAIS EM PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA	375
E. BARAJAS; R. YUSTE; A. VICENTE; J. YUSTE RESPONSE TO TYPE OF DRIP IRRIGATION, OVERGROUND AND UNDERGROUND, OF FOUR RED GRAPE VARIETIES (<i>Vitis vinifera</i> L) TRADITIONALLY GROWN IN CASTILLA Y LEON	385
Pilar RAMÍREZ; Jesús LASHERAS; Juan Manuel LEÓN; Ana Isabel LUCENA; José MORALES EFFECTOS DEL USO DE UNA CUBIERTA VEGETAL EN EL RENDIMIENTO, VIGOR Y CALIDAD DE LA UVA	395
Manuel OLIVEIRA; Carlos CASTRO; Maria José CORREIA; Rui COSTA; Ana Alexandra OLIVEIRA SAP FLOW AND VARIATION ON STEM DIAMETER TO DETERMINE THE WINEGRAPE WATER STATUS	405

PRESENT & COMING DIAGNOSTIC TOOLS FOR GRAPEVINE PATHOGENS DETECTION: THE MERCIER NOVATECH EXPERIENCE

Corinne ROMAND¹; Emilie CARROUCHÉ¹; Olivier ZEKRI².

¹Mercier NOVATECH – Le Champ des Noël's, 85770, LE GUE DE VELLUIRE, France

²Mercier FRERES – 16 Rue de la Chaignée, 85770, VIX, France

corresponding author: olivier.zekri@mercier-groupe.com

Abstract:

One of the best ways to prevent grapevine diseases caused by intra and intercellular pathogens is to detect, before plantation, if the vegetal material is pathogen-free. As grapevine nursery, Mercier Company has a strong sanitary diagnostic strategy to provide grafted plants as clean as possible. Viruses' diagnostic has been used routinely for more than 20 years now by Mercier. Leafroll Viruses (GLRaV-1, -3) and Nepoviruses (ArMV & GFIV) are systematically and regularly looked for in rootstock and scion mother-blocks by ELISA technology. In the last few years, Mercier NOVATECH, part of the Mercier Group, has developed new diagnostic methods, more sensitive, by PCR technology, to detect other grapevine pathogens (fungi responsible for ESCA, Eutypa Dieback, Black Foot Disease and Bot. Cankers, *Agrobacterium vitis*, Flavescence Dorée, Bois Noir...). But all these methods are only qualitative (determining the presence or the absence of the pathogens into the plants). With the help of new biotechnologies (qPCR, LAMP, microarray...), it will be possible soon to detect more pathogens and to quantify them. Mercier NOVATECH will present those great improvements for grapevine pathogens control.

Key words: Grapevine, nursery, diagnostic, ELISA, PCR, qPCR, microarray, LAMP, virus, fungi, bacteria.

INTRODUCTION

There are two kinds of pathogen diseases, those which could be controlled by pesticides and those incurable. For perennial productions as grapevine production, preventive diagnostic is the only way to control incurable diseases. Laboratory testing for grapevine

diseases is useful for diagnosing problems in existing vineyards. Identifying infected propagation wood can help growers avoid spreading diseases to new vineyards. In the past, detection of viruses in grapevines was largely accomplished by laborious and slow biological tests. Today, many of the most important grapevine viruses, bacteria and fungi can be detected using fast laboratory tests. Since accurate diagnostic tools are available, Mercier Novatech laboratory uses those tools to detect pathogens in wood material.

Laboratory testing for a nursery is a valuable tool to better understand eventual vineyard problems, because field diagnosis of grapevine diseases can be difficult. Symptoms displayed in the field are rarely unique to a particular disease. In addition, some infected vines may not show any symptoms indicative of their disease status. More often, a particular set of symptoms could result from a number of causes. Red or yellow leaves, for example, could be an indication of a virus or phytoplasma disease, a fungal root disease, a nutritional deficiency, physical damage, or feeding by mites or insects. Disease testing is often used to help sort out the true nature of the problem leading to symptom expression.

It is virtually impossible to diagnose grape pathogens diseases in the field during the dormant season, a season when many growers and nurseries cut wood for propagation. In addition, grapevines infected with some disease agents may never show any obvious symptoms. Such latent infections can only be detected with reliable disease testing methods. This is an important consideration when collecting wood for propagating new vines, since diseases that may not be evident on rootstock and scions.

Several methods of disease testing are available. These include direct culture of disease agents; serological tests, such as ELISA; and molecular tests, such as Polymerase Chain Reaction (PCR). Other types of new tests, based on advanced technologies, are also coming to viticulture sector.

As a nursery, Mercier Frères follows the Commission Directive 2005/43/CE relative to the material for the vegetative propagation of the vine and controls in the mother block plantation the absence of infectious degeneration i. e. Grapevine Fanleaf Virus (GF1V) and Arabic Mosaic virus (ArMV), grapevine leafroll disease i. e. Grapevine Leafroll-

associated Virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine Leafroll-associated Virus-3 (GLRaV-3) and Grapevine Fleck Virus (GFkV) only for rootstocks. Mercier Novatech laboratory uses ELISA technology, registered as official detection method in France, to detect those viruses. In addition, other diagnostic methods were developed, based on molecular technologies (PCR) to detect Crown Gall disease agent (*Agrobacterium vitis*), Flavescence Dorée and Bois noir agents, and several fungi involved in different Wood Trunk Diseases complex (*Eutypa lata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoaniella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Cylindrocarpon destructans*...).

Today, to improve the diagnosis sensitivity, Mercier Novatech is also investigating and developing new diagnostic tools based on modern technology as Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Flavescence Dorée detection, Microarray for fungi and *Agrobacterium vitis* detection, and qPCR for all grapevine pathogens.

1 - Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

One of the most common and inexpensive virus diagnostic methods is ELISA. The assay involves the binding of the virus' outer shell with a specific antibody. An antibody is a special kind of protein made by an animal's immune system in response to foreign invasion. Antibodies have specific binding sites that "recognize" a molecular shape.

Because of the ability of antibody molecules to precisely recognize and bind to certain shapes on other molecules, antibody-binding activity is used to specifically identify viruses and other plant pathogens. The binding of the virus to the antibody is unique, much like a jigsaw puzzle, fitting a unique piece into each place so there is no doubt about the accuracy of results.

With the ELISA method, ground plant tissue extracts are placed in a test plate that has been coated with specific antibodies. If the virus is present in the sample, it will bind to the specific antibodies on the plate and be detected by an enzyme-substrate reaction that produces a color reaction.

The advantages of ELISA are that many samples can be tested at the same time, it is relatively inexpensive and it is fast (results can be obtained in about three days). However, it should only be used as a screening method because it can miss infections if the pathogen is found in low concentration.

In France, it is ELISA method which is so far the official method for virus diagnostic. Mercier Novatech is accredited under ISO 17025 since 2007 for the detection of GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3. But many other grapevine viruses could be detected using this technology.

2 - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Recently, molecular tests have been developed that directly target the genetic material (genome) of plant pathogens. Rather than relying on antibody reactions, they specifically target molecular sequences that are unique to a particular pathogen. One of the most sensitive molecular methods for pathogen detection currently available is PCR.

PCR involves the selective amplification of a small part of a pathogen's genome. If the pathogen is present in a sample, even in a very low amount, the amplification steps allow its detection. It is this exponential amplification that makes PCR such a sensitive test.

PCR can be used for the detection of pathogens in grapevine because each virus, bacterium, or fungus has its own unique genetic information. In the past decade, molecular scientists have identified genetic markers for many of these pathogens. Commercial PCR testing is currently available for many viral and bacterial pathogens of grapevine. This is an active area of research and this list is sure to expand.

Mercier Novatech has developed his own diagnostic tools to detect on grapevine by conventional PCR: Flavescence Dorée and Bois Noir Phytoplasmas, *Agrobacterium vitis* (under ISO 17025 accreditation), and *Eutypa lata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Cylindrocarpon destructans*...

3 - Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

In molecular biology, real-time Polymerase Chain Reaction, also called quantitative real time Polymerase Chain Reaction (qPCR) or kinetic Polymerase Chain Reaction is a laboratory technique based on the PCR, which is used to amplify and simultaneously quantify a targeted DNA molecule. For one or more specific sequences in a DNA sample, qPCR enables both detection and quantification. The quantity can be either an absolute number of copies or a relative amount when normalized to DNA input or additional normalizing genes.

The procedure follows the general principle of Polymerase Chain Reaction; its key feature is that the amplified DNA is detected as the reaction progresses in real time. This is a new approach compared to standard end-point PCR, where the product of the reaction is detected after cycling is complete. Two common methods for detection of products in real-time PCR are: (1) non-specific fluorescent dyes that intercalate with any double-stranded DNA, and (2) sequence-specific DNA probes consisting of oligonucleotides that are labeled with a fluorescent reporter which permits detection only after hybridization of the probe with its complementary DNA target. Frequently, real-time PCR is combined with reverse transcription to quantify messenger RNA and non-coding RNA in cells or tissues, suitable for Virus detection.

qPCR can also be used for the detection of pathogens in grapevine, with faster results and possibility to quantify the amount of pathogens. Mercier Novatech is developing special primers for grapevine pathogens in order to get more information about the phytosanitary status of wood material. It provides a useful tool to assess nursery pathogen control as well.

Many studies have compared PCR and ELISA based methods. The experience of most laboratories has been that real-time PCR is an order of magnitude more sensitive than conventional PCR and two orders of magnitude more sensitive than ELISA. However, PCR and real-time PCR are both requiring specialized equipment and consumables; and whilst their costs are coming down they still exceed ELISA's and can be a constraint in terms of initial capital outlay and running costs.

4 - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

As mentioned above, a disadvantage of PCR is the cost of the specialized equipment required to perform accurately controlled thermal cycling, and in the case of real-time PCR, concurrent monitoring of fluorescence. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a method for the detection of specific nucleic acid sequences and has the potential to overcome many of the limitations of PCR-based methods. The ability of LAMP to amplify a target nucleic acid sequence under isothermal conditions removes the need for thermal cycling equipment, allowing testing to be carried out with minimal equipment (a water bath or heated block). Furthermore, simplified methods for the detection of amplification products facilitate the use of LAMP-based methods in the field or in less well-resourced settings.

LAMP is an amplification method which uses 2 pairs of primers (internal and external primers) and a DNA polymerase with strand displacing activity to produce amplification products containing loop regions to which further primers can bind, allowing amplification to continue without thermal cycling. Amplification is accelerated by the use of an additional set of primers (loop primers) that bind to those loops which are of the incorrect orientation for the internal primers to bind. A high level of specificity results from the requirement for primers to bind to up to 8 regions of the target sequence. The use of LAMP has previously been described for the detection of a range of plant pathogens (Tomlinson et al. 2009; Harper et al. 2010)

LAMP reactions generate a large amount of amplification product that can be detected by conventional agarose gel electrophoresis, by the use of spectrophotometric equipment to measure turbidity, in real-time using intercalating fluorescent dyes, or by visual inspection of turbidity or colour changes. While detection methods based on visual inspection have the advantage of requiring no equipment, assessment of colour or turbidity with the unaided eye is potentially subjective. Equipment-free methods for unambiguous detection of LAMP products would increase the feasibility of using LAMP for detection of phytopathogens outside the laboratory. One such method is the use of lateral flow devices (LFDs) for the detection of labels incorporated into the amplification products.

Mercier Novatech is involved since 2011 in a European FP7 project – VITISENS – with the target to develop a rapid detection method for *Flavescence dorée* directly in the field, based on LAMP technology.

A rapid DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) procedure was developed and evaluated for the detection of two specific groups of phytoplasmas from infected plant material. Primers based upon the 16–23S intergenic spacer (IGS) region were evaluated in LAMP assays for amplification (Tomlinson et al. 2010).

The DNA extractions and LAMP assay are easy to perform, requiring minimal equipment, and may therefore form the basis of a rapid and reliable field-detection system for phytoplasmas. Mercier Novatech should start the first tests with this device in 2014.

5 - Microarray

DNA microarray technique is one of the latest advances in the field of molecular biology and medicine. It is a multiplex technique used in combination of bioinformatics and statistical data analysis (Kostrzynska et al. 2006). Microarray detection provides the greatest capability for parallel yet specific testing and can be used to detect individual or combinations of viruses plant disease (Boonham et al. 2007). This new technology has been developed for a rapid, accurate and sensitive detection of plant pathogens with the objective to use this technique extensively in routine practices.

Mercier Novatech is starting a new European FP7 Project – MYCORRAY – to develop an inexpensive microarray chip for fungi and bacteria pathogen detection.

References

- Boonham, N., J. Tomlinson and R. Mumford, 2007.
- Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45: 307-328.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691887>
- Golino, D., Rowhani, A., 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. *Practical winery & vineyards* January/February
- Monis, J. 2005. Pinpointing Grapevine Virus Diseases
- Harper, S. J., Ward, L. I., and Clover, G. R. G. 2010. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100:1282-1288.
- Kostrzynska, M. and A. Bachand, 2006. Application of DNA microarray technology for detection, identification and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.*, 52: 1-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541153>
- Tomlinson, J. A., Dickinson, M. J., and Boonham, N. 2010. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology* 100:143-149.

METODOLOGIAS DE ESTUDO DA INTERACÇÃO GENÓTIPO×AMBIENTE NA FASE FINAL DA SELECÇÃO CLONAL DA VIDEIRA

Elsa GONÇALVES¹; Antero MARTINS¹

RESUMO

A fase final de um processo de selecção clonal deverá contemplar a compreensão e controlo da interacção genótipo × ambiente ($G \times E$) dos clones, um fenómeno biológico altamente perturbador da estabilidade de comportamento de todas as variedades geneticamente homogéneas (como são tipicamente esses clones). Neste trabalho apresentam-se várias técnicas de interpretação desse fenómeno passíveis de serem utilizadas numa fase final de selecção de clones de videira. Estas metodologias são aplicadas ao estudo da sensibilidade à interacção de 12 clones pré-seleccionados de cada uma das castas Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha, avaliados em 11, 14 e 8 ambientes (local×ano), respectivamente. Após a análise de variância ter revelado interacção genótipo × ambiente significativa ($p < 0,05$), foram aplicadas outras técnicas, como a análise de regressão dos valores observados do rendimento de um genótipo sobre os índices ambientais e *GGE Biplots*. Como resultado, foi possível encontrar diferenças de sensibilidade à interacção $G \times E$, e verificou-se que, de entre as técnicas utilizadas, a do *GGE biplot* forneceu uma visão mais clara do comportamento dos clones nos diversos ambientes.

Palavras-chave: videira, selecção clonal, interacção genótipo × ambiente, regressão sobre os índices ambientais, *GGE biplots*

1 – INTRODUÇÃO

A fase final de um processo de selecção clonal deverá contemplar a compreensão e controlo da interacção genótipo × ambiente dos clones, um fenómeno biológico altamente perturbador da estabilidade de comportamento de todas as variedades geneticamente homogéneas (como são tipicamente esses clones).

¹ Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, CBAA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Tel.: 21 365 3190; elsagoncalves@isa.utl.pt; anteromart@isa.utl.pt

Apesar de no mundo vitícola serem, em geral, os clones certificados a suportarem grande parte das novas plantações (na França, Itália e Espanha existem centenas de clones certificados e em Portugal existem largas dezenas), não tem sido dada a devida importância aos estudos de interacção genótipo×ambiente com clones de videira.

Segundo a metodologia de selecção da videira praticada em Portugal (Martins, 2011), o processo conducente à selecção clonal desenvolve-se ao longo de um período de 10 a 15 anos. Isto pressupõe a avaliação do comportamento do clone em diferentes locais (tantos mais quanto possível) e, como a videira é uma planta perene, dentro destes, no maior número de anos possível. A noção de ambiente estará, portanto, hierarquizada. Por um lado, o local distinto (que abrange as condições edafo-climáticas do local, porta-enxerto, etc.) e, dentro do local, os diferentes anos. No final deste processo deverão existir dados para que seja realizada uma análise minimamente objectiva da interacção genótipo×ambiente dos clones a submeter a homologação oficial.

No melhoramento de plantas em geral, as principais técnicas aplicáveis ao estudo deste fenómeno recorrem geralmente à análise de variância clássica com interacção e a métodos baseados na teoria dos modelos mistos (Barford *et al.*, 2004; Smith *et al.* 2005; Kelly *et al.* 2007; Smith *et al.*, 2007), à análise de regressão das observações sobre os índices ambientais (Finlay e Wilkinson, 1963; Eberhart e Russell, 1966), a métodos não paramétricos baseados na ordenação dos genótipos em diferentes ambientes (Hühn, 1996) e à análise em componentes principais (Kempton, 1984; Gauch e Zobel, 1997). Este último tipo de análise tem muitas variantes, dependendo da transformação aplicada aos dados antes de se fazer a decomposição em valores singulares. Os modelos mais usados são os modelos AMMI (“Additive main effects and multiplicative interaction”) e GGE (“Genotype main effects and Genotype×Environment interaction effects”). Presentemente, estes modelos estão entre os métodos estatísticos mais usados para analisar dados de rendimento de ensaios agrícolas (Gauch, 2006; Yan *et al.*, 2007; Gauch, 2008; Yang *et al.*, 2009; Yan e Holland, 2010).

No âmbito dos trabalhos de selecção da videira realizados em Portugal pela “Rede Nacional de Selecção da Videira”, os clones têm vindo a ser estudados quanto à interacção,

recorrendo à representação gráfica da ordenação dos clones quanto a diferentes características nos diversos ambientes, ao coeficiente de variação de diferentes características nos distintos ambientes experimentais, à análise de regressão das observações de diferentes características sobre os índices ambientais (Martins *et al.*, 1998a; Martins *et al.*, 1998b; Martins *et al.* 2004) e, mais recentemente, a métodos não paramétricos (Gonçalves e Martins, 2012).

O presente trabalho é mais um contributo para o reforço metodológico do estudo do fenómeno da interacção genótipo \times ambiente em clones de videira. Analisam-se três técnicas de interpretação do fenómeno passíveis de serem utilizadas numa fase final de selecção de clones: análise de variância, análise de regressão dos valores observados do rendimento de um genótipo sobre os índices ambientais e construção de *GGE Biplots*.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados utilizados referem-se ao rendimento (kg/planta) das castas Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha e são provenientes de ensaios de selecção de dois tipos sequenciais: grandes populações experimentais de clones (POP) e pequenos ensaios de comparação de clones multilocais (CCClo) com os 30 a 40 clones seleccionados na POP (Quadro 1). Considerando cada combinação local/ano como um ambiente distinto, estudaram-se no total 11, 14 e 8 ambientes para a Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha, respectivamente.

Quadro 1 - Descrição dos locais dos ensaios das castas Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha, delineamento experimental, anos de avaliação do rendimento e respectiva designação do ambiente

Castas	Local	Delineamento experimental (RCB)	Anos	Designação do ambiente
Síria	Pinhel (P)	239 clones \times 5 repetições \times 4 plantas (POP)	1988 e 1989	P1988 e P1989
	Figueira de Castelo Rodrigo (F)	40 clones \times 8 repetições \times 6 plantas (CCClo)	1991 a 1995	F1991 a F1995
	Estremoz (E)	40 clones \times 8 repetições \times 6 plantas (CCClo)	1991 a 1999	E1991 a E1999
Antão Vaz	Evora (E)	210 clones \times 5 repetições \times 3 plantas (POP)	1988 a 1990	E1988 a E1990
	Palmela (P)	40 clones \times 8 repetições \times 7 plantas (CCClo)	1993 a 1998	P1993 a P1998
	Vidigueira (V)	40 clones \times 8 repetições \times 7 plantas (CCClo)	1998 a 2002,	V1998 a V2002
Rabo de Ovelha	Reguengos de Monsaraz (RG)	250 clones \times 4 repetições \times 5 plantas (POP)	1994 a 1998	RG1994 a RG1998
	Redondo (RD)	32 clones \times 8 repetições \times 7 plantas (CCClo)	1996 a 2000	RD1996 a RD2000

RCB – blocos casualizados completos.

Ao longo do processo de selecção, a análise dos dados foi orientada para a seriação dos clones, segundo os melhores preditores lineares empíricos não enviesados dos efeitos genotípicos de diferentes características (rendimento, teores de açúcar, acidez, pH do mosto e outras), bem como para o cálculo de outros indicadores de determinismo genotípico das mesmas, como a heritabilidade em sentido lato, cujas estimativas variaram entre 0,36 e 0,90 na casta Síria, entre 0,24 e 0,74 na casta Antão Vaz e 0,38 e 0,93 na casta Rabo de Ovelha. Com base em todas as análises realizadas e na avaliação da interacção genótipo×ambiente, fez-se a pré-selecção de 12 clones superiores: uns com um bom equilíbrio de todas as características relevantes, outros com os valores mais elevados de cada uma dessas características. No ciclo final, esses 12 clones foram avaliados, a partir dos mesmos ensaios dos ciclos anteriores, quanto a um leque mais alargado de características culturais e enológicas (incluindo microvinificações experimentais) e de novo quanto à interacção genótipo×ambiente, com vista à selecção de aproximadamente 7 clones individuais para submeter a homologação. O presente trabalho é focado precisamente sobre esses 12 clones pré-seleccionados.

A abordagem metodológica seguida neste trabalho irá envolver três procedimentos. No primeiro, estudar-se-ão os efeitos da interacção clone×ambiente através do ajustamento do modelo

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta(\gamma)_{jk} + e_{ijk}, \quad (1)$$

para $i = 1, L, g$, $j = 1, L, c$, $k = 1, L, b_j$, $n = g \times \sum_{j=1}^c b_j$, sendo n o número total de observações e b_j o número de blocos completos do ensaio do local j . Neste modelo y_{ijk} designa a média do rendimento do clone i no bloco k do ambiente j , μ a média geral, α_i o efeito genotípico do clone i , γ_j o efeito do ambiente j , $(\alpha\gamma)_{ij}$ o efeito da interacção do clone i com o ambiente j , $\beta(\gamma)_{jk}$ o efeito do bloco k do ambiente j , e_{ijk} o erro aleatório associado à ijk -ésima observação. Os erros aleatórios assumiram-se variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas com distribuição normal de valor médio e variância. Todos os efeitos do modelo assumiram-se como fixos. Após o ajustamento deste modelo foram realizados testes F aos efeitos previstos no modelo. Nesta análise foram utilizados apenas os dados referentes aos 12 clones.

O segundo procedimento para avaliação da estabilidade fenotípica de cada um dos 12 clones, baseou-se na regressão dos rendimentos do clone nos vários ambientes sobre os índices ambientais (Finlay e Wilkinson, 1963). Assim, ajustou-se o modelo,

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \quad (2)$$

para $i = 1, L, n$, sendo n o número de ambientes onde o clone foi avaliado. Neste modelo, y_i representa o índice ambiental do ambiente i (média de todos os clones no ambiente i), β_0 a ordenada na origem, β_1 o coeficiente de regressão, x_i o rendimento do clone no ambiente i . Os erros aleatórios assumiram-se variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas com distribuição normal de valor médio 0 e variância σ_e^2 .

Segundo Finlay e Wilkinson (1963), um coeficiente de regressão de 1 ($\beta_1 = 1$) indica que o genótipo tem estabilidade média. Desta forma a estabilidade média do clone foi avaliada através de um teste T ao parâmetro β_1 (testando-se $H_0 : \beta_1 = 1$ vs $H_0 : \beta_1 \neq 1$).

Finalmente, o terceiro procedimento para avaliação da interacção clone×ambiente, baseou-se na construção de *GGE Biplots* (ou seja, de *biplots* dos efeitos principais do genótipo e efeitos da interacção genótipo×ambiente). Nesta análise foram utilizados os dados de todos os clones dos ensaios de comparação clonal. Antes da decomposição em valores singulares, os dados foram transformados de acordo com a expressão $\frac{(\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{.j})}{SE_j}$, onde \bar{y}_{ij} representa a média de rendimento do genótipo i no ambiente j , $\bar{y}_{.j}$ é o rendimento médio de todos os genótipos no ambiente j ; SE_j é o erro padrão no ambiente j (ou seja, raiz quadrada do quadrado médio residual resultante do ajustamento do modelo com todos os genótipos do ensaio). Este é o chamado “SE-scaled GGE biplot”, o preferido quando existem dados com repetições (Yan, 2001), como são os utilizados neste trabalho.

A análise dos dados foi feita recorrendo ao procedimento *Proc Mixed* (SAS Institute 2003) e ao programa *R*, *version 2.15.0*. (The R Foundation, 2012).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à análise de variância com apenas os 12 clones pré-seleccionados por casta, constam do Quadro 2. Para um nível de significância de 0,05, a casta Antão Vaz não revelou interacção clone×ambiente significativa ($p > 0,05$), tendo sido apenas detectados efeitos significativos associados aos factores clone e ambiente. Para

as castas Síria e Rabo de Ovelha foram detectados efeitos significativos da interacção entre genótipos e ambiente ($p < 0,05$). Nestes casos, a interacção torna-se, assim, o principal objecto de estudo e as abordagens seguintes tentarão determinar quais os clones mais sensíveis à mudança de ambiente.

Os resultados obtidos com a metodologia da regressão dos rendimentos do clone sobre os índices ambientais constam do Quadro 3. Para um nível de significância de 0,05, todos os clones de Antão Vaz revelaram estabilidade média, pois em nenhum caso se rejeitou a hipótese do coeficiente de regressão ser 1 ($p > 0,05$). Para o mesmo nível de significância, na casta Síria a hipótese de estabilidade média foi rejeitada para cinco clones (CR0330, CR2213, CR4501, CR4503, CR9106) e na casta Rabo de Ovelha a estabilidade média foi rejeitada para quatro clones (OV0519, OV0704, OV0813, OV1612).

Quadro 2 - Valores-p (p) associados aos testes aos efeitos previstos no modelo de análise de variância (modelo 1), nas castas Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha

Casta	Fonte de variação	p
Síria	clone	<0,0001
	ambiente	<0,0001
	bloco(ambiente)	<0,0001
	clonexambiente	<0,0001
Antão Vaz	clone	0,0025
	ambiente	<0,0001
	bloco(ambiente)	<0,0001
	clonexambiente	0,1228
Rabo de Ovelha	clone	<0,0001
	ambiente	<0,0001
	bloco(ambiente)	<0,0001
	clonexambiente	<0,0001

Quadro 3 - Resultados da análise de regressão dos rendimentos do clone sobre os índices ambientais (modelo 2) para os 12 clones das castas Síria, Antão Vaz e Rabo de Ovelha

Síria				Antão Vaz				Rabo de Ovelha			
clone	R^2	b_1	p	clone	R^2	b_1	p	clone	R^2	b_1	p
CR0210	0,963	0,880	0,0669	AN0123	0,928	1,06	0,1184	OV0512	0,779	1,109	0,6678
CR0236	0,925	0,847	0,0912	AN0134	0,968	0,85	0,0683	OV0519	0,935	0,646	0,0022
CR0330	0,955	0,879	0,0087	AN0145	0,951	0,88	0,0550	OV0704	0,979	0,811	0,0080
CR1607	0,884	1,079	0,5582	AN0166	0,918	1,00	0,0862	OV0813	0,921	0,688	0,0092
CR2213	0,937	0,783	0,0105	AN0173	0,950	0,96	0,0507	OV0906	0,632	1,157	0,6788
CR4501	0,972	0,836	0,0069	AN0185	0,911	0,84	0,0678	OV0913	0,746	1,295	0,3760
CR4503	0,949	0,818	0,0188	AN0238	0,956	0,87	0,0788	OV1001	0,766	1,765	0,1030
CR4507	0,936	0,959	0,6345	AN0245	0,928	0,85	0,0537	OV1104	0,709	1,162	0,6138
CR9102	0,923	0,851	0,1019	AN0250	0,869	0,99	0,0647	OV1612	0,939	0,732	0,0125
CR9106	0,909	0,765	0,0169	AN0263	0,954	0,92	0,0647	OV1818	0,883	0,759	0,0760
CR9304	0,951	0,912	0,2332	AN0506	0,933	0,85	0,0565	OV6302	0,939	0,868	0,1956
CR9313	0,897	0,945	0,6196	AN0512	0,944	1,02	0,0786	OV7105	0,768	0,657	0,0589

R^2 - coeficiente de determinação, b_1 - estimativa do coeficiente de regressão, p - valor-p do teste $H_0 : \beta_1 = 1$ vs $H_1 : \beta_1 \neq 1$.

Relativamente aos *GGE Biplots*, apenas se apresentam os resultados referentes às castas Rabo de Ovelha e Síria, uma vez que na casta Antão Vaz o *GGE biplot* resultante explicou apenas 34,5% da variação do rendimento devida aos efeitos principais do genótipo e efeitos da interacção genótipo×ambiente (GGE). Relativamente às castas Síria e Rabo de Ovelha, os *biplots* resultantes explicaram, respectivamente, 62,7% e 78,7% da variação do rendimento devida ao GGE (Figuras 1A e 1B, respectivamente).

Em ambos os casos estudados, a fraca correlação observada entre alguns ambientes revela a presença de interacção genótipo×ambiente. No que se refere à Síria (Figura 1A), ambientes correspondentes à localização de Pinhel estão negativamente correlacionados e, na casta Rabo de Ovelha, dois anos em Reguengos não estão correlacionados. Isto é, o que separa mais o ambiente decorre principalmente do efeito ano do que do efeito do local. Por outro lado, as diferenças entre o poder discriminatório de um ambiente (ou seja, a diferenciação entre genótipos) são visíveis em ambas as figuras. Entre os ambientes estudados a diferenciação entre os genótipos foi maior em E1998 e E1999, na casta Síria, e no RD1999, RD1997 e RD1996, na casta Rabo de Ovelha. Estes foram precisamente os ambientes em que se obtiveram estimativas da heritabilidade em sentido lato mais elevadas. Contrariamente, nos ambientes E1992 e E1993 na Síria (vectores de menor comprimento, próximos da origem do *biplot*), os genótipos tiveram um comportamento semelhante.

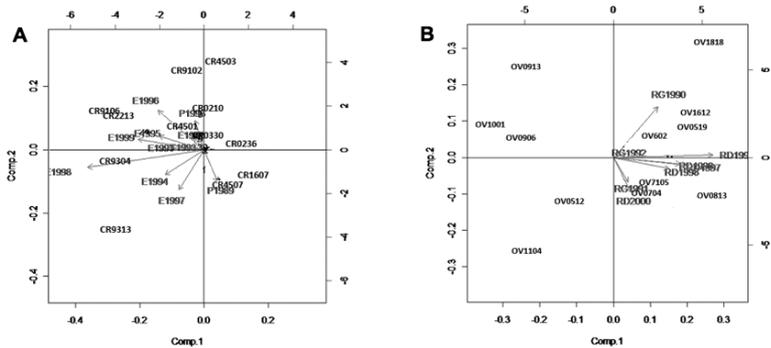


Figura 1 – *GGE Biplots* para as castas Síria (A) e Rabo de Ovelha (B), onde estão apenas representados os 12 clones de entre os 40 (para a Síria) e 32 (para a Rabo de Ovelha) contemplados na análise.

Analisando o comportamento dos diferentes genótipos de Síria (Figura 1A), com esta abordagem destacou-se um grupo de clones cuja mudança de comportamento se revelou mais sensível com a mudança de ambiente. Aproximadamente em metade dos ambientes esses clones comportaram-se acima da média (Estremoz/1996, 1995, 1992 e 1999 e Pinhel 1988) e noutra metade abaixo da mesma (Estremoz/1998, 1994 e 1997 e Pinhel em 1989). Com este tipo de comportamento estão os clones CR4503, CR9102, CR0210 e CR0330. Outro grupo de clones evidenciou sistematicamente rendimentos acima da média em todos os ambientes, à exceção de um único. São os casos dos clones CR9106, CR2213, CR4501, CR9304, que só revelaram rendimento abaixo da média em Pinhel/1989, e do clone CR9313 que só revelou rendimento abaixo da média em Pinhel/1988. Foi possível observar ainda um conjunto de clones cujos rendimentos se situaram maioritariamente abaixo da média. Por exemplo, o clone CR0236 apresentou sempre rendimentos próximos ou abaixo da média. O clone CR1607 revelou rendimento acima da média apenas em Pinhel/1989, e o CR4507 em Pinhel/1989 e Estremoz/1997 e 1994 (este último, portanto, mais instável que os anteriores).

Quanto à casta Rabo de Ovelha (Figura 1B), também se destacou um grupo de clones cuja mudança de comportamento se revelou mais acentuada com a mudança de am-

biente. Em certos ambientes esses clones comportaram-se acima da média e noutros abaixo da média. São os casos dos clones OV1818, OV0512 e OV1104: o primeiro revelou sempre rendimentos acima da média, excepto em Reguengos/1991 e Redondo/2000; os dois últimos, apresentaram rendimento abaixo da média em todos os ambientes, excepto em Reguengos/1991 e Redondo/2000. Foi possível ainda identificar outro grupo de clones mais estáveis. Alguns desses evidenciaram sempre rendimentos muito perto da média ou acima desta em todos os ambientes, são os casos dos clones OV1612, OV0519, OV6302, OV0813, OV0704 e OV7105, enquanto que outros manifestaram sempre rendimentos muito perto da média ou abaixo desta em todos os ambientes, são os casos dos clones OV0913, OV1001 e OV0906.

Como vimos, diferentes abordagens poderão, ou não, conduzir a conclusões similares sobre a interacção genótipo×ambiente. De facto, quer com análise de variância (modelo 1), quer com a análise de regressão (modelo 2), as conclusões sobre a interacção foram as mesmas. Relativamente à casta Antão Vaz, não se identificaram com a análise de variância efeitos significativos da interacção e, com a análise de regressão, não se rejeitou para nenhum clone a hipótese da estabilidade média. No respeitante às castas Síria e Rabo de Ovelha, com a análise de variância detectaram-se efeitos significativos da interacção e, utilizando a análise de regressão, a hipótese de estabilidade média foi rejeitada para alguns clones. Contrariamente, os resultados quanto ao comportamento individual dos clones diferiram entre a análise de regressão e a interpretação do *GGE biplot*. Isso poderá dever-se ao facto de na análise de regressão as rectas serem ajustadas com base em valores fenotípicos e de essa análise ser tanto mais eficaz quanto maior o número de ambientes (um número reduzido de observações irá induzir à não rejeição da hipótese da estabilidade média). Ora, neste estudo o número de ambientes não foi tão elevado quanto o que seria desejável, principalmente no respeitante à casta Rabo de Ovelha. Desta forma, a técnica da regressão é, a nosso ver, a mais frágil de entre as técnicas apresentadas. Quando utilizada, é importante tomar em consideração as estimativas da heritabilidade em sentido lato obtidas nos ensaios onde se obtiveram esses dados e, em princípio, eliminar os dados provenientes de ensaios com heritabilidades baixas. Pelo, contrário, para a decomposição em valores singulares não se utilizaram os valores fenotípicos, mas sim valores transformados de acordo com o descrito da metodologia e,

portanto, a técnica do *GGE biplot* fornece uma visão mais geral, englobando a informação sobre as correlações entre ambientes (indicadora do grau de interacção), sobre o poder discriminatório de cada ambiente (o comprimento do vector de um ambiente é determinado pela heritabilidade nesse ambiente) e sobre o comportamento dos clones nos diversos ambientes (Yan e Holland, 2010). Esta técnica não foi usada com sucesso na casta Antão Vaz, em parte devido às baixas heritabilidades obtidas nos vários ambientes (de entre os 14 ambientes estudados, em 9 a heritabilidade foi inferior a 0,45).

O estudo da interacção genótipo \times ambiente deverá ser conduzido numa vasta gama de ambientes, de modo a autorizar a previsão sobre se um genótipo é largamente adaptado a uma vasta amplitude de condições ambientais, ou se, pelo contrário, é mais apropriado para condições ambientais específicas. Esta é a prática comum no melhoramento de outras espécies, com as quais é inteiramente exequível a instalação de numerosos ensaios multilocais, o que está longe de se verificar com a videira. De facto, se desta análise não foi possível destacar determinados clones particularmente adaptados a determinados locais isso poderá estar associado ao reduzido número de locais utilizados, o que aponta para a conveniência de se perseguir sempre o objectivo de instalação do maior número de ensaios multilocais. Outro aspecto importante na análise dos resultados obtidos prende-se com a importância do ano na definição de ambiente distinto. A imprevisibilidade do comportamento do clone face às condições do ano, alerta para o perigo de utilização de clones individuais por parte do viticultor e constitui mais um argumento para reforçar a importância da investigação relativa à interacção genótipo \times ambiente no quadro da selecção clonal.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram encontrar diferenças de sensibilidade à interacção $G \times E$ entre clones, embora não igualmente para as diferentes castas. Relativamente à casta Antão Vaz, não se identificaram com a análise de variância efeitos significativos da interacção e, com a análise de regressão, não se rejeitou para nenhum clone a hipótese da estabilidade média. No respeitante às castas Siria e Rabo de Ovelha, com a análise de variância detectaram-se efeitos significativos da interacção e, utilizando a análise de regressão, a hipótese de estabilidade média foi rejeitada para alguns clones. O *GGE bi-*

plot foi de entre as técnicas utilizadas a que forneceu uma visão mais completa sobre os ambientes e o comportamento dos clones nos diversos ambientes, permitindo também fazer uma separação de clones quanto à sensibilidade à interacção.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da “Rede Nacional de Selecção da Videira”, pela sua contribuição na colheita de dados e à “Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal” pelo apoio financeiro (BPD/43218/2008; PEst-OE/AGR/UI0240/2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basford, K.E., Federer, W.T., DeLacy, I.H. (2004) – Mixed model formulations for multi-environment trials. *Agronomy Journal*, **96**:143-147.
- Eberhart, S.A., Russell, W.A. (1966) - Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*, **6**:36-40.
- Finlay, K.W., Wilkinson, G.N. (1963) – The analysis of adaptation in a plant breeding program. *Australian Journal of Agricultural Research*, **14**:742-754.
- Gauch, H.G. (2006) – Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Science*, **46**:1488-1500.
- Gauch, H., Piepho, H.P., Annicchiarico, P. (2008) – Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE: further considerations. *Crop Science*, **48**:866-889.
- Gauch, H.G., Zobel R.W. (1997) - Identifying mega-environments and targeting genotypes. *Crop Science*, **37**: 311-326.
- Gonçalves, E., Martins, A. (2012) - Avaliação da estabilidade de clones da casta Arinto através de medidas não paramétricas. *Simpósio Vitivinícola da Região de Lisboa*, Oeiras, 26-27 de Outubro.
- Kelly, M.K., Smith, A.B., Eccleston, J.A., Cullis, B.R. (2007) - The accuracy of varietal selection using factor analytic models for multi-environment plant breeding trials. *Crop Science*, **47**(3):1063-1070.
- Kempton, R.A. (1984) - The use of biplots in interpreting cultivar by environment interactions. *Journal of Agricultural Science*, **103**:123-135.
- Martins, A. (2011) - Selecção das castas de videira, uma história com raízes nas regiões do Douro e dos Vinhos Verdes. *In: Francisco Girão, Um inovador da Vitivinicultura do Norte de Portugal*. Vol II pp205-229. Fundação Francisco Girão. Lisboa.
- Martins, A., Mestre, S., Carneiro, L.C., Gonçalves, E. (1998a) - Estabilidade do rendimento de clones de videira. *In: Actas 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, vol. 1:23-29.
- Martins, A., Carneiro, L., Mestre, S., Gonçalves, E., Neves-Martins, J., Almeida, C., Ramadas, I., Eiras-Dias, J.E., Madeira, D., Magalhães, N. (1998b) - Facteurs d’instabilité du rendement de

- clones de videira. In: *Actas XXIII Congrès Mondial de la Vigne et du Vin*. Lisboa, vol. 1:169-174.
- Martins, A., Gonçalves, E., Carneiro L.C. (2004) - Instabilidade do rendimento de clones de videira resultante da interação genótipo×ambiente e estratégias experimentais para a sua redução. In: *Actas 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, vol. 1: 97-102.
- SAS Institute (2003). *SAS proprietary software release 9.1*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smith, A.B., Cullis, B.R., Thompson, R. (2005) - The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: an overview of current mixed model approaches. *Journal of Agricultural Science*, **143**: 449-462.
- Smith, A.B., Stringer, J.K., Wei, X., Cullis, B.R. (2007) - Varietal selection for perennial crops where data relate to multiple harvests from a series of field trials. *Euphytica*, **157**: 253-266.
- The R Foundation (2012) - *R version 2.15.0*. The R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org>.
- Yan, W. (2001) – GGEbiplot-A Windows application for graphical analysis of multi-environment trial data and other types of two-way data. *Agronomy Journal*, **93**:1111-1118.
- Yan, W., Holland, J. (2010) - A heritability-adjusted GGE biplot for test environment evaluation. *Euphytica*, **171**:355-369.
- Yan, W., Kang, M., Ma, B., Woods, S., Cornelius, P. (2007) - GGE Biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. *Crop Science*, **47**: 643-655.
- Yang, R., Crossa, J., Cornelius, P., Burgueño, J. (2009) - Biplot analysis of genotype×environment interaction: proceed with caution. *Crop Science*, **49**:1564-1123.

A IMPORTÂNCIA DA CASTA ‘ALFROCHEIRO’ NA ORIGEM DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA VIDEIRA EM PORTUGAL

Jorge CUNHA^{1,2*}; Javier IBÁÑEZ³; Margarida TEIXEIRA-SANTOS⁴; João BRAZÃO¹; Pedro FEVEREIRO^{2,5}; José Miguel MARTINEZ-ZAPATER^{3,6} e José E. EIRAS-DIAS¹

RESUMO

‘Tinta Francesa’, ‘Tinta Francisca de Viseu’, ‘Tinta Bastardeira’ ou ‘Tinta Bastardinha do Douro’ são alguns dos sinónimos tradicionalmente utilizados pelos vitivinicultores para a identificação da casta ‘Alfrocheiro’, nas regiões onde predominantemente é cultivada - regiões do Douro e do Dão. Actualmente a ‘Alfrocheiro’ é considerada uma casta de elevado potencial genético, quer para o vitivinicultor, quer para os melhoradores genéticos (fitomelhoradores).

Este trabalho aborda a importância da casta ‘Alfrocheiro’ na diversidade genética do encepamento Português. A genotipagem com 250 marcadores de polimorfismo de nucleótido único (Single Nucleotide Polimorphisms – SNPs), foi fundamental para identificar o seu parentesco com as castas autóctones Portuguesas: ‘Malvasia Preta’, ‘Tinta Gorda’, ‘Cornifesto’, ‘Camarate’, ‘Castelão’, ‘Jampal’, ‘Casteloa’, ‘Castelã’, ‘Casculho’ e ‘Moreto’.

Palavras-chave: ‘Alfrocheiro’, parentesco, Single Nucleotide Polimorphisms – SNPs

¹ INIAV, Quinta d’Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Portugal;

² UNL, ITQB - Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal;

* Autor para correspondência jorge.cunha@iniav.pt

³ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-Universidad de La Rioja - Gobierno de La Rioja), Complejo Científico Tecnológico, C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain;

⁴ INIAV, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal;

⁵ Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal;

⁶ Dpto. de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, C/Darwin 3, 28049, Madrid, Spain.

1 - INTRODUÇÃO

‘Alfrocheiro’ é o nome principal da casta que outrora também foi designada por ‘Tinta Francisca de Viseu’, ‘Tinta Bastardeira’, ‘Tinta Bastardinha do Douro’ ou, menos frequentemente, ‘Alfurcheiro’. Esta casta também faz parte do encepamento de Espanha com as designações de ‘Albarin Negro’, ‘Albarin Tinto’, ‘Baboso Negro’, ‘Brunal’, ‘Caino Gordo’ (<http://www.vivc.de/>).

A adoção de ‘Alfrocheiro’ poderá ter surgido pelo facto de ‘Tinta Bastardeira’ ser um nome confundível com ‘Bastardo’ (nome principal ‘Trousseau Noir’ e número 12668 no VIVC (Vitis International Variety Catalogue) e ‘Bastardo Tinto’, sinónimo de ‘Tinta-de-Lisboa’ (PRT051-51108, e número 22972 no VIVC), duas castas distintas da ‘Alfrocheiro’. A história da Alfrocheiro remonta a 1790, sendo referida como uma casta de uvas pretas cultivada em Lamego e suas vizinhanças (LACERDA LOBO, 1790). O Visconde de VILLA MAIOR (1866) afirmava que *“esta casta tinta cultivava-se em Macedo de Cavaleiros, é a mesma do Douro, e dá muito bom vinho. Na quinta dos Arcyprestes (Alto Douro) achavam que produzia muito e bom vinho. É uma das castas tintas que mais abundava no concelho de Sabrosa, e é das predominantes nas vinhas das encostas de Casal de Loivos”*. Em 1875, o mesmo autor considerou esta casta semelhante ao ‘Bastardo’, com cachos muito fechados, mas de sabor pouco agradável; *“produz bastante, apodrece muito, quer terrenos fortes e é pouco estimada”*. Por outro lado, Ferreira Lapa já havia afirmado que era das castas que no Douro produzia muito vinho, mas de inferior qualidade à de outras (LAPA, 1874). FIGUEIREDO (1875) considerava-a uma das castas tintas do Douro – ‘Tinta Bastardeira’ – muita produtiva mas que originava um vinho corado e pouco alcoólico. Em 1876, a casta é referenciada na coleção ampelográfica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (VILLA MAIOR, 1876).

Desconhecem-se as razões da adoção de ‘Alfrocheiro’ em detrimento de qualquer um dos outros sinónimos enumerados anteriormente, uma vez que MENEZES (1896) falava de um ‘Alfrocheiro’, sem clarificar a cor do bago. Contudo na 2ª metade do século XX, com a reforma do sector vitivinícola, associada ao processo de pré-adesão de Portugal à Comunidade Económica Europeia, e com a inventariação de todas as castas autóctones do País, já constava a denominação de ‘Alfrocheiro Preto’. Em Portugal foram publicados 11 catálogos com a identificação, caracterização e descrição das castas existentes

nas diferentes regiões vitícolas e, ainda, a descrição das castas de uva de mesa mais utilizadas e das novas obtensões da Estação Agronómica Nacional (EAN). A designação e caracterização da ‘Alfrocheiro’, então designada por ‘Alfrocheiro Preto’, encontram-se descritas nos catálogos das regiões do Dão, da Bairrada, do Ribatejo-Oeste e Península de Setúbal e do Alentejo, fazendo alguns deles referência aos sinónimos ‘Tinta Bastardinha do Douro’ e ‘Tinta Francisca de Viseu’.

Mais recentemente, a utilização de 6 marcadores moleculares do tipo microssatélite (SSRs) (ALMADANIM *et al.* 2007; VELOSO *et al.* 2010) veio confirmar os sinónimos supra citados que já haviam sido identificados em estudos morfológicos (ALMEIDA 1986; BANZA 1986; PEREIRA e DUARTE 1986; EIRAS-DIAS *et al.* 1988) e afirmar a correcta identificação da casta ‘Alfrocheiro’. Em alternativa ao uso de SSRs, é hoje possível utilizar marcadores de nucleótido único (Single Nucleotide Polimorphisms – SNPs). A genotipagem com estes marcadores é menos dispendiosa e o número de marcadores a que se pode recorrer é muito maior do que os SSRs, pois são abundantes na maioria dos genomas (BRUMFIELD *et al.* 2003). Recentemente, a utilização de SNPs tornou possível identificar a identidade de castas, elaborar mapas genéticos, realizar estudos de paternidade (CABEZAS *et al.* 2011; LIJAVETZKY *et al.* 2006), de estrutura genética e de história da domesticação da videira (MYLES *et al.* 2011).

O presente estudo tem por objectivo clarificar a identificação e origem da designação da casta ‘Alfrocheiro’, assim como identificar a descendência gerada por este progenitor associada à obtenção de outras variedades autóctones. O número de castas geradas como progenitor torna a ‘Alfrocheiro’ um pilar fundamental no núcleo de diversidade da videira na Península Ibérica e, em especial, em Portugal.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal

Todos os materiais vegetais estudados foram colhidos na Coleção Ampelográfica Nacional (PRT051) do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, localizada em Dois Portos, na ex-Estação Vitivinícola Nacional. Foram seleccionadas todas as “entra-

das” de ‘Alfrocheiro’ e as que expressam um perfil genético ou morfológico próximo (Tabela 1). Sempre que possível as castas estudadas estão referenciadas com o nome principal e número de variedade proposto pelo VIVC (<http://www.vivc.de/>).

Tabela 1 - Referência e nome da entrada na CAN, código e nome principal no VIVC das castas estudadas

Referência CAN	Nome da entrada na CAN	Código VIVC	Nome Principal VIVC
52402	Camarate T	2018	Camarate Tinto T
50901	Casculho T	14149	Casculho T
51002	Castelã T	15672	Castelã T
52615	Castelao Branco B	2321	Castelao Branco B
53106	Castelão T	2324	Castelão T
41303	Casteloa T	23126	Casteloa T
52004	Cornifesto T	2846	Cornifesto T
52515	Jampal B	5662	Jampal B
52512	Malvasia Fina B	715	Malvasia Fina B
53205	Malvasia Preta T	15647	Malvasia Preta T
52503	Jaen T	7623	Mencia T
52301	Moreto T	7992	Moreto T
50607	Tinta Gorda T	8082	Mouraton T
52906	Tinta Grossa T	40711	Tinta Grossa T
52216	Trincadeira das Pratas B	15688	Trincadeira das Pratas B
50902	Conceira T	14144	Conceira T
51610	Alfrocheiro Branco B	8864	Douradinha B
53308	Malvarisco T	17249	Malvarisco T
52702	Parreira Matias T	15683	Parreira Matias T
52003	Alfrocheiro Preto T	277	Alfrocheiro T
51316	Sarigo B	5648	Cayetana Blanca B
	Allam T		

T - bago tinto; B - bago branco.

2.2 - Análise de ADN

O ADN (Ácido desoxirribonucleico) foi isolado a partir de folhas jovens congeladas, utilizando o método descrito por CUNHA *et al.* (2010). As variedades em causa foram genotipadas no Cento Nacional de Genotipagem de Espanha (CEGEN, www.cegen.es) para SNPs previamente identificados por CABEZAS *et al.* (2011) e segundo ZINELA-BIDINE *et al.* (2012).

Análise de parentesco

A análise de parentesco foi calculada com base em perfis de SNPs, utilizando o software CERVUS 3.0 (KALINOWSKI *et al.* 2007). A análise foi realizada utilizando 1120 variedades como possíveis progenitores (dados não apresentados), dos quais 191 são variedades portuguesas.

Resultados e Discussão

Todas as castas em estudo apresentam um perfil único para o conjunto dos 48 SNPs usados por CABEZAS *et al.* (2011) para identificação de castas, ou seja, não foram encontrados sinónimos entre elas (191 castas). A análise de parentesco foi efectuada utilizando as 191 amostras de génotipos únicos portugueses mais 929 génotipos existentes na base de dados do ICVV (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino), muitos dos quais procedentes do Banco de Germoplasma de Vitis (VGB) do IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario), em El Encín. Os 1120 génotipos únicos foram genotipados com um conjunto de 332 SNPs (resultados não apresentados). Depois de descartados os SNPs ausentes e os não polimórficos, foram obtidos 250 SNPs para as castas propostas, que foram submetidas à análise de parentesco. As castas propostas para progenitores e descendentes incluem trios de progenitores e descendentes anteriormente encontrados com SSRs (BOWERS *et al.* 1999; CABEZAS *et al.* 2003; IBÁÑEZ *et al.* 2009; VARGAS *et al.* 2009; LACOMBE *et al.* 2012) e SNPs (IBÁÑEZ *et al.* 2012; ZINELABIDINE *et al.* 2012), para controle da metodologia adotada na análise dos parentescos.

Para cada possível progenitor e par de progenitores foi calculado o “*Logarithm of odds*” (LOD) com o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI *et al.* 2007). O *LOD scores* é a probabilidade de um determinado indivíduo ser o progenitor de uma *prole*, dividido pela probabilidade de os indivíduos não estarem relacionados (GERBER *et al.* 2003). O limite a partir do qual o valor de LOD indica a presença de parentesco foi determinado empiricamente através da validação de *pedigrees* conhecidos (LACOMBE *et al.* 2012).

De todos os possíveis cruzamentos encontrados (trios possíveis, progenitores e descendentes), foram seleccionados aqueles que estão directamente relacionados com a casta ‘Alfrocheiro’ e todas as cultivares que partilham pelo menos um alelo por *locus* (nos

250 SNPs analisados) com esta casta e, portanto, mantêm uma suposta relação de progenitor/descendente. Assim, é possível identificar 10 castas provenientes dos progenitores ‘Sarigo’ e ‘Alfrocheiro’ com um LOD compreendido entre 69 e 88,2 (Tabela 2) e ainda 10 castas que apresentam um alelo comum à variedade ‘Alfrocheiro’ (Figura 2).

Tabela 2 - Resumo dos trios e descendentes encontrados para os progenitores Alfrocheiro e Sarigo

Descendente		SNP comparados	Trio	
Referência CAN	Nome de entrada		LOD	
50607	Tinta Gorda	247	78.7	a)
52004	Cornifesto T	240	70.3	a), b)
52402	Camarate Tinto T	239	79.0	a), b)
53106	Castelão T	250	86.4	a), b)
53205	Malvasia Preta T	248	88.2	a)
41303	Casteloa N	211	71.0	
50901	Casculho N	212	69.0	
51002	Castelã N	209	76.7	
52515	Jampal B	218	76.4	
52301	Moreto T	247	71.3	b)

a) Descendentes, previamente identificados por Zinelabidine et al., (2012), utilizando SNPs
b) Descendentes, previamente encontrados por Lacombe et al., (2012), utilizando SSRs

Conforme é referido na Tabela 2, em estudos anteriores, ZINELABIDINE *et al.* (2012) identificaram 5 destas descendentes, utilizando SNPs, e LACOMBE *et al.* (2012), utilizando 20 SSRs, identificaram 4 descendentes, das quais 3 são comuns às identificadas pelos primeiros autores. Com este trabalho, foram encontradas 5 outras castas descendentes da ‘Alfrocheiro’ (‘Casteloa’, ‘Casculho’, ‘Castelã’, ‘Jampal’ e ‘Moreto’), sendo que a ‘Moreto’ já havia sido identificada por LACOMBE *et al.* (2012) utilizando SSRs. Foram, igualmente, identificadas 10 castas possivelmente descendentes diretas da ‘Alfrocheiro’, das quais se desconhece um progenitor, ou seja a ‘Alfrocheiro’ partilha um alelo por *locus* com as castas: ‘Allarn’, ‘Malvasia Fina’, ‘Tinta Grossa’, ‘Trincadeira das Pratas’, ‘Jaen’, ‘Concieira’, ‘Douradinha’, ‘Malvarisco’, ‘Parreira Matias’ e ‘Castelão Branco’ (Figura 2). Estes resultados manifestam claramente que a ‘Alfrocheiro’ é uma

casta “primitiva” na diversidade das castas portuguesas. A casta ‘Sarigo’ (nome principal ‘Cayetana Blanca’ e número 5648, no VIVC) é também conhecida pelos sinónimos ‘Mourisco Branco’, no Alentejo e ‘Boal Carrasquenho’ e ‘Dona Branca’, na Estremadura, sendo originária da região sudoeste da Península Ibérica, mais precisamente, na zona limítrofe entre o Alentejo (Portugal) e Badajoz (Espanha) (LOPES *et al.* 2006, ZINELABIDINE *et al.* 2012). As relações comerciais entre a Península Ibérica e o Norte de África proporcionaram a introdução e a disseminação desta casta em Marrocos, sendo conhecida neste país por ‘Djinani’. Segundo ZINELABIDINE *et al.* (2012), esta casta esteve na origem de várias castas autóctones Ibéricas, sendo algumas delas, atualmente, muito utilizadas na elaboração de vinho de qualidade.

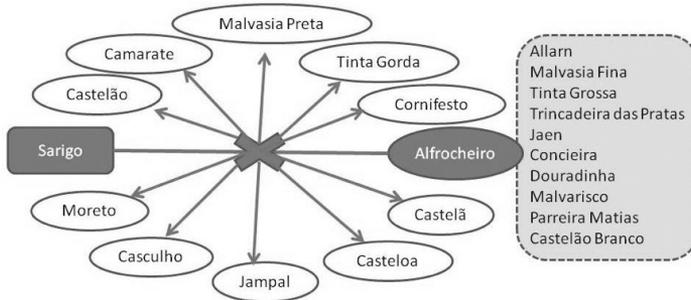


Figura 2 - Relações genéticas encontradas para a casta ‘Alfrocheiro’. As linhas sólidas indicam *pedigree* completo (trio, progenitores e descendentes), enquanto as cultivares limitadas com linhas tracejadas indicam a partilha em pelo menos um alelo por *locus* nos 250 SNPs analisados (possível progenitor e descendentes).

CONCLUSÃO

As análises de parentesco com recurso a SNPs permitem identificar, com uma baixa probabilidade de erro, os parentescos entre variedades cultivadas de uma mesma espécie. A utilização de um conjunto de 250 marcadores deste tipo permitiu desvendar a importância da casta ‘Alfrocheiro’ no encepamento Português, assinalando a sua ancestralidade e o potencial para criar diversidade.

A ausência de referências sobre a utilização da casta ‘Alfrocheiro’ como progenitor das

castas enumeradas leva-nos a considerar que estas surgiram de um (ou mais) cruzamento(s) natural(ais) seguido(s) de um crescimento marginal, que o homem aproveitou e multiplicou, tendo resistido à invasão da filoxera e às doenças criptogâmicas responsáveis pela erosão genética da *Vitis vinifera*, nos finais do século XIX. Algumas das castas identificadas como descendentes, bem como os progenitores, são hoje consideradas interessantes do ponto vista enológico, como as castas ‘Moreto’, ‘Castelão’ e ‘Jampal’, sendo a sua preservação e multiplicação assegurada pelos vitivincultores que as usam para produção de uvas. As castas minoritárias, ou seja, as praticamente não utilizadas pelos nossos vitivincultores, devem ser preservadas nos bancos de germoplasma com o objectivo de as estudar e valorizar. Tudo a seu tempo terá o seu devido valor!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por: IVV – Instituto da Vinha e do Vinho (MAMAOT); “Fundação para a Ciência e Tecnologia” (SFRH/BPD/ 74895/2010); Programa de Desenvolvimento Rural (PRODER - Ação 2.2.3.1. - PA 18621 - MAMAOT) e Projeto COST (European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research) Action FA1003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADANIM M.C., BALEIRAS-COUTO M.M., PEREIRA H.S., CARNEIRO L.C., FEVEIREIRO P., EIRAS-DIAS J.E., MORAIS-CECILIO L., VIEGAS W., VELOSO M.M. (2007) Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars most utilized for wine production in Portugal. *Vitis* 46, 116-119.
- ALMEIDA C.R. (1986) Catálogo das Castas. Região Demarcada da Bairrada. Instituto de Gestão e Estruturação Fundiária, Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral. Lisboa.
- BANZA J.P. (1986) Catálogo das Castas. Região do Alentejo. Instituto de Gestão e Estruturação Fundiária, Direcção Regional de Agricultura do Alentejo. Lisboa.
- BOWERS J., BOURSQUOT J.-M., THIS P., CHU K., JOHANSSON H., MEREDITH C. (1999) Historical Genetics: The Parentage of Chardonnay, Gamay, and Other Wine Grapes of North-eastern France. *Science* 285, 1562-1565.
- BRUMFIELD R.T., BEERLI P., NICKERSON D.A., EDWARDS S.V. (2003) The utility of single

- nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 249-256.
- CABEZAS J.A., CERVERA M.T., ARROYO-GARCIA R., IBÁÑEZ J., RODRÍGUEZ-TORRES I., BORREGO J., CABELLO F., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. (2003) Garnacha and Garnacha Tintorera: Genetic Relationships and the Origin of Teinturier Varieties Cultivated in Spain. *Am J Enol Vitic e* 54, 237-245.
- CABEZAS J.A., IBAÑEZ J., LIJAVETZKY D., VÉLEZ D., BRAVO G., RODRÍGUEZ V., CARREÑO I., JERMAKOW A.M., CARREÑO J., RUIZ-GARCIA L., THOMAS M.R., MARTINEZ-ZAPATER J.M. (2011) A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biology* 11, 153.
- EIRAS-DIAS J.E., PEREIRA C.A., CUNHA J.P. (1988) Catálogo das Castas. Região do Ribatejo, Oeste e Península de Setúbal. Instituto da Vinha e do Vinho, Estação Vitivinícola Nacional. Lisboa.
- GERBER S., CHABRIER P., KREMER A. (2003) Famoz: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Mol Ecol Notes* 3, 479-481.
- IBAÑEZ J., MUÑOZ-ORGANERO G., ZINELABIDINE L.H., DE ANDRÉS M.T., CABELLO F., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. (2012) Genetic Origin of the Grapevine Cultivar Tempranillo. *Am J Enol Vitic* 63, 549-553.
- IBAÑEZ J., VARGAS A.M., PALANCAR M., BORREGO J., DE ANDRES M.T. (2009) Genetic Relationships among Table-Grape Varieties. *Am J Enol Vitic* 60, 35-42.
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16, 1099-1106.
- LACERDA LOBO C. (1790) Memoria sobre a cultura das vinhas em Portugal. Academia Real das Ciencias de Lisboa, Lisboa.
- LACOMBE T., BOURSICQUOT J.M., LAUCOU V., VECCHI-STARAZ M., PÉROS J.-P., THIS P. (2012) Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theor Appl Genet*, 1-14.
- LAPA J.I.F. (1874) Tecnologia rural. 2ª ed., 1874. *Cit. In: MENEZES P.* (1896)
- LIJAVETZKY D., RUIZ-GARCÍA L., CABEZAS J., DE ANDRÉS M., BRAVO G., IBAÑEZ A., CARREÑO J., CABELLO F., IBAÑEZ J., MARTÍNEZ-ZAPATER J. (2006) Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics* 276, 427-435.
- LOPES M.S., dos SANTOS M.R., DIAS J.E.E., MENDONÇA D., da CÂMARA MACHADO A. (2006) Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellite markers. *Journal of Biotechnology* 127, 34-44.

- MENEZES P. (1896) Apontamentos para o estudo da Ampelographia Portugueza. Boletim da Direcção Geral de Agricultura. Ministério das Obras Publicas. Comercio e Industria, Imprensa Nacional, Lisboa.
- MYLES S., BOYKO A.R., OWENS C.L., BROWN P.J., GRASSI F., ARADHYA M.K., PRINS B., REYNOLDS A., CHIA J.-M., WARE D., BUSTAMANTE C.D., BUCKLER E.S. (2011) Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3530-3535.
- PEREIRA C.D., DUARTE A.P. (1986) Catálogo das Castas. Região Demarcada do Dão. Instituto de Gestão e Estruturação Fundiária. Lisboa.
- VARGAS A.M., DE ANDRÉS M.T., BORREGO J., IBÁÑEZ J. (2009) Pedigrees of Fifty Table-Grape Cultivars. *Am J Enol Vitic* 60, 525-532.
- VELOSO M.M., ALMANDANIM M.C., BALEIRAS-COUTO M., PEREIRA H.S., CARNEIRO L.C., FEVEREIRO P., EIRAS-DIAS J. (2010) Microsatellite database of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal. *Cienc Tec Vitivinic* 25, 53-61.
- VILLA MAIOR V.D. (1876) Douro Ilustrado. *Cit. In*: MENEZES P. (1896).
- ZINELABIDINE L.H., HADDIOUI A., RODRIGUEZ V., CABELLO F., EIRAS-DIAS J.E., MARTINEZ ZAPATER J.M., IBÁÑEZ J. (2012) Identification by SNP Analysis of a Major Role for Cayetana Blanca in the Genetic Network of Iberian Peninsula Grapevine Varieties. *Am J Enol Vitic* 63, 121-126.

COLEÇÃO AMPELOGRÁFICA NACIONAL: PRESERVAÇÃO DO PATRIMÓNIO VARIETAL DE VITIS VINIFERA L.

Jorge CUNHA ; *; Margarida TEIXEIRA-SANTOS ; João BRAZÃO e José E. EIRAS-DIAS¹

Resumo

Para garantir a preservação a longo prazo das castas cultivadas em Portugal é necessário gerir os procedimentos destinados à sua multiplicação e o rejuvenescimento periódico no banco de germoplasma conservado na Coleção Ampelográfica Nacional (CAN).

Desde o final da sua instalação, em 1988, tem-se efetuado um vasto número de estudos com vista à caracterização das castas existentes, sendo atualmente possível definir critérios de seleção dos materiais vegetais a multiplicar e a rejuvenescer, no âmbito da instalação em curso da nova CAN.

Neste trabalho é dado conhecimento desses estudos e das ações realizadas da CAN, nomeadamente estudos de índole morfológica, molecular e sanitária.

Palavras-chave: preservação, germoplasma de videira e Coleção Ampelográfica Nacional (CAN).

1 - INTRODUÇÃO

A Coleção Ampelográfica Nacional (PRT051) foi criada em 1988, no âmbito do projeto Ampelografia e Sinonímia das Castas de Videira, coordenado pelo Engº Castro Reis, de que resultou uma extensa prospeção em todo o país, onde numerosas variedades autóctones foram recolhidas em coleções regionais e em vinhas velhas em produção e/ou abandonadas. Esta coleção contém também referências internacionais de *Vitis vinifera* e de porta-enxertos, assim como, outras espécies de *Vitis*. Recentemente foram introduzidos genótipos de plantas *sylvestris* encontrados em três bacias hidrográficas diferentes:

¹ INIAV, Quinta d'Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Portugal;

² UNL, ITQB - Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal;

* Autor para correspondência jorge.cunha@iniav.pt

³ INIAV, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal;

Tejo, Sado e Guadiana. O objetivo inicial da instalação desta colecção visava resolver os problemas de sinonímias e homonímias dispersos pelas diferentes regiões vitivinícolas, assim como, a preservação da diversidade varietal da videira existente em Portugal.

No período pós-instalação foram desenvolvidos numerosos trabalhos de caracterização morfológica com base nos descritores da Organisation Internationale de la Vigne e du Vin (OIV), tendo-se encontrado uma parte considerável de sinonímias e homonímias. Posteriormente, com o advento da biologia molecular, através da utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSRs) foram encontradas novas sinonímias e homonímias e foram comprovados todos os casos previamente definidos através da descrição morfológica.

O período de vida útil de uma CAN do género *Vitis* está situado entre 20 e 30 anos, dependendo da natureza do solo e das susceptibilidades das variedades em causa a factores bióticos e abióticos. Assim, a manutenção e gestão de uma colecção de germoplasma é uma tarefa complexa e onerosa. Para assegurar a preservação a longo prazo, são necessários procedimentos para uma multiplicação segura ou para o rejuvenescimento periódico do germoplasma conservado, a fim de reduzir as possibilidades de erosão genética durante estas actividades.

Com este trabalho pretende-se demonstrar a importância da caracterização das variedades de videira, com vista à sua preservação e perpetuação às gerações vindouras.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e delineamento

A CAN (PRT051) é propriedade do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e fica situada na Quinta da Almoinha, freguesia de Dois Portos, concelho de Torres Vedras. Encontra-se instalada num solo do tipo Aluviossolos Modernos de textura mediana, calcários e ocupa uma área aproximada de 2,08 ha.

Esta colecção contém um total de 754 genótipos, vulgarmente designados por “entradas”, sendo 691 de *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*, 30 de *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, 24 de porta-

enxertos e 9 de outras espécies de *Vitis*. Todas as “entradas” encontram-se enxertadas no mesmo porta-enxerto (SO4) e cada uma é representada por sete plantas provenientes da mesma planta-mãe.

2.2 - Caracterização morfológica

Esta caracterização é obtida por rotina durante os diferentes estádios de desenvolvimento da videira, segundo Baillod & Baggiolini (COOMBE, 1995). Baseia-se em características morfológicas enumeradas nas diferentes versões dos descritores da OIV (OIV, 1983; 2007).

2.3 - Caracterização molecular

A caracterização molecular baseia-se em análises de ADN utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSRs) presentes no núcleo das células e dos cloroplastos. Muito recentemente, também estão a ser utilizados SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para a análise de ADN. O ADN é normalmente extraído de folhas jovens, que podem ser colhidas entre os estádios de desenvolvimento E e M de Baillod & Baggiolini (COOMBE, 1995). A extração do ADN e a Polymerase Chain Reaction (PCR) são efetuadas de acordo com Cunha et al. (2010). Os microssatélites utilizados são os recomendados pela OIV (OIV 2007) e LAUCOU et al. (2011). Os SNPs utilizados são os recomendados por LIJAVETZKY et al. (2007), sendo que a genotipagem foi efetuada segundo CABEZAS et al. (2011).

2.4 - Caracterização sanitária

Esta caracterização baseia-se em testes, pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), para os nove principais vírus da videira: vírus do urticado ou nó curto (Grapevine fanleaf virus, GFLV), vírus do mosaico do Arabis (Arabis mosaic virus, ArMV), vírus do enrolamento da videira - vírus associados 1, 2, 3 e 7 (Grapevine leafroll associated virus, GLRaV-1, 2, 3 e 7), o vírus do marmoreado da videira (Grapevine fleck virus, GFkV) e 2 vírus do complexo do lenho rugoso (Grapevine virus A, GVA e Grapevine virus B, GVB) (SANTOS et al. 2012).

2.5 - Análise de dados

A análise dos dados pressupõe a elaboração de matrizes capazes de serem lidas por softwares específicos, consoante os objectivos pretendidos.

Para análise morfológica e caracterização sanitária dos vírus, normalmente utilizamos o NTSYS pc (ROLF, 2000), enquanto que para a análise molecular utilizamos softwares de genética molecular, tais como: IDENTITY (WAGNER and SEFC 1999), GENEALEX (PEAKALL and SMOUSE 2012), Cervus 3.0 (Field Genetics, London, UK) (KALINOWSKI et al. 2007) e Toolkit (PARK, 2001).

3 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Todas as “entradas” da CAN são descritas segundo um número restrito dos descritores morfológicos recomendados pela OIV (OIV, 1983). Numa 1ª fase, a seriação dos descritores utilizados, assim como as “entradas” consideradas são definidas de acordo com os “dados de passaporte”, inicialmente recolhidos pelo coletor e pelo curador da CAN: nome da “entrada” e origem geográfica. Na sua continuação são seleccionados grupos mais restrito de “entradas” para serem caracterizadas através de um número mais alargado de descritores, para comprovar uma preliminar identificação, tais como: i) extremidade do pâmpano jovem: abertura, intensidade antociânica e densidade de pelos eretos e prostrados, ii) folha adulta média: forma, recorte, número de lóbulos, abertura dos seios laterais e peciolar, forma, iii) cacho médio: o tamanho, a forma e a compacidade, iv) bago médio: cor, forma, coloração da polpa e sabores particulares. Actualmente, cerca de 130 “entradas” já se encontram descritas de acordo com estes últimos descritores morfológicos.

A análise destes parâmetros conduz-nos para a necessidade, ou não, de aplicar uma caracterização molecular, utilizando o set de 6 ou 9 SSRs recomendado pela OIV para identificação de variedades de videira (OIV, 2007). Se os resultados nos conduzirem a uma nova variedade, então é efetuada uma caracterização morfológica mais pormenorizada e detalhada. Nestas circunstâncias iniciamos também um processo de microvinificação da casta em causa.

A descrição morfológica pormenorizada e a utilização do set de 6 ou 9 SSRs recomendado pela OIV, permitiram diferenciar, na CAN, 243 castas autóctones. Estes resultados indicam-nos a existência de uma proximidade morfológica e genética entre castas, pelo que estamos a utilizar um set de 19 dos SSRs recomendados por (LAUCOU et al. 2011) para identificação e pedigree das 243 castas autóctones. Estes resultados estão também a ser comprovados através de dois sets de 48 e 192 SNPs (240 SNPs). O primeiro é utilizado para identificação e o segundo para pedigree.

Os resultados obtidos através dos testes ELISA para a despistagem de vírus da videira permitem-nos seleccionar, entre os diferentes sinónimos encontrados para a mesma variedade, o genótipo isento ou com baixos níveis de infecção por vírus. As variedades representadas por um único genótipo que se encontre infectado com vírus são também preservadas para evitar a sua perda, evitando assim a erosão da variabilidade intervarietal da videira.

A renovação e a ampliação da CAN pressupõem todo este conhecimento prévio para cada um dos genótipos a utilizar na instalação da nova CAN, para que a erosão genética seja muito reduzida ou nula. A actual CAN só será arrancada quando todas as “entradas” transferidas estejam a vegetar em boas condições na nova CAN e seja comprovada a sua identidade.

Desta forma, os obtentores de variedades de videira e outros investigadores têm assegurada a preservação da diversidade varietal e podem seleccionar o germoplasma para as suas necessidades específicas.

4 - AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BPD/74895/2010) e pelo Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território (PRODER - Ação 2.2.3.1. - PA 18621).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABEZAS J.A., IBÁÑEZ J., LJAVETZKY D., VÉLEZ D., BRAVO G., RODRÍGUEZ V., CARREÑO I., JERMAKOW A.M., CARREÑO J., RUIZ-GARCIA L., THOMAS M.R., MARTINEZ-ZAPATER J.M. (2011) A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biology* 11, 153.
- COOMBE B.G. (1995) Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust J Grape Wine R* 1, 104-110.
- CUNHA J., TEIXEIRA-SANTOS M., VELOSO M., CARNEIRO L., EIRAS-DIAS J., FEVEIREIRO P. (2010) The Portuguese *Vitis Vinifera* L. Germplasm: Genetic Relations between Wild and Cultivated Vines. *Cienc Tec Vitivinic* 25, 25-37.
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16, 1099-1106.
- LAUCOU V., LACOMBE T., DECHESNE F., SIRET R., BRUNO J.P., DESSUP M., DESSUP T., ORTIGOSA P., PARRA P., ROUX C., SANTONI S., VARÈS D., PÉROS J.P., BOURSIQUOT J.M., THIS P. (2011) High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theor Appl Genet* 122, 1233-1245.
- LJAVETZKY D., CABEZAS J., IBÁÑEZ A., RODRIGUEZ V., MARTINEZ-ZAPATER J. (2007) High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Plant Biology* 8, 424.
- OIV (1983) Descriptor list for grapevine varieties and vitis species. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). Paris.
- OIV (2007) Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species. Office International de la Vigne et du Vin (OIV), Paris, 2nd edition.
- PARK S.D.E. (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetics Effects of Selection. [Ph.D. thesis] University of Dublin, Dublin.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- ROLF J. (2000) NTSYSpc version 2.0 Exeter Software. Setauket, New York.
- SANTOS M.T., BRAZÃO J., CUNHA J., EIRAS-DIAS J. (2012) Renewing and enlarging and the Portuguese Ampelographic Collection: screening for nine viruses by Elisa. Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Davis, California, USA., 272-273.
- WAGNER H.W., SEFC K.M. (1999) IDENTITY,1.0. Wienn: Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences.

COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE CASTAS TINTAS NACIONAIS E ESTRANGEIRAS CULTIVADAS EM DUAS REGIÕES VITIVINICOLAS PORTUGUESAS (DOURO E DÃO)

Elisa COSTA¹; João FERREIRA DA SILVA^{1,2}; Fernanda COSME²; António M. JORDÃO¹

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial fenólico de 7 castas tintas (Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah, Tinta Roriz e Touriga Nacional) cultivadas em duas vinhas experimentais com idade semelhante, uma localizada na região do Douro e outra localizada na região do Dão. Os parâmetros fenólicos objeto de estudo nos anos de 2010 e de 2011 para todas as castas foram os teores em compostos fenólicos totais, compostos fenólicos flavonóides, compostos fenólicos não flavonóides, antocianinas totais e ainda a intensidade da cor. As castas estudadas foram ainda caracterizadas ao nível dos principais parâmetros químicos gerais (teor alcoólico provável, pH, acidez total e ácido tartárico).

No geral, os resultados apontaram para que nos dois anos objeto de análise e para os vários parâmetros fenólicos estudados, as amostras de uvas provenientes da vinha localizada na região do Dão, apresentaram uma composição fenólica mais elevada, comparativamente aos valores quantificados nas mesmas castas mas provenientes da vinha localizada na região do Douro. Apesar desta tendência geral, saliente-se ainda que a casta Touriga Nacional, constituiu para alguns parâmetros (compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas totais) uma exceção, tendo-se obtido no geral valores médios mais elevados nas amostras provenientes da vinha localizada na região do Douro.

Palavras chave: Castas tintas, composição fenólica, Dão, Douro.

¹ Instituto Politécnico de Viseu (CI&DETS) - Escola Superior Agrária, Quinta da Alagoa, Estrada de Nelas, 3500-606 Viseu. Email: antonijordao@esav.ipv.pt

² Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genómica e Biotecnologia (IBB-CGB/UTAD), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real. Email: fcosme@utad.pt

1 - INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, várias castas de origem estrangeira têm sido introduzidas nos encepamentos das diferentes regiões vitivinícolas Portuguesas, tendo em algumas regiões, a sua representatividade aumentado de forma bastante acentuada. Por outro lado, e em paralelo, as castas Tinta Roriz e Touriga Nacional (esta última com maior destaque) são duas das castas tintas nacionais com grande representatividade em várias das regiões vitivinícolas nacionais.

Vários trabalhos têm comprovado que a composição fenólica das castas tintas, depende de vários fatores, nomeadamente, do potencial intrínseco de cada casta (JORDÃO *et al.* 1998a), dos fatores climáticos (COHEN *et al.* 2008), das características do solo e ambientais (MATEUS *et al.* 2002), das práticas culturais (JORDÃO *et al.* 1998b; OLLÉ *et al.* 2011) e ainda dos níveis de produção (PRICE *et al.* 1995). Por outro lado, a composição fenólica das uvas das castas tintas é um parâmetro cada vez mais importante, na sua avaliação qualitativa, visto entre outros aspetos, condicionar as opções tecnológicas envolvidas na elaboração dos vinhos e consequentemente a sua qualidade.

Diversos estudos relativos à composição fenólica de várias castas tintas têm sido efetuados em algumas regiões vitivinícolas nacionais (JORDÃO *et al.* 1998a; MATEUS *et al.* 2002; DOPICO-GARCÍA *et al.* 2008; COSME *et al.* 2009). No entanto, relativamente a estudos comparativos entre as regiões do Douro e do Dão, ao nível de castas tintas nacionais e estrangeira produzidas simultaneamente nessas duas regiões, existe uma escassa informação de resultados publicados.

Assim, de forma a aprofundar o conhecimento do potencial fenólico de várias castas tintas de origem nacional e estrangeira, o presente estudo teve por objetivo avaliar a composição fenólica de 7 castas (5 estrangeiras e 2 nacionais) cultivadas em duas vinhas experimentais, uma localizada na região do Douro e outra localizada na região do Dão.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

Foram estudadas à maturação tecnológica, 7 castas tintas (Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah, Tinta Roriz e Touriga Nacional). As uvas foram colhidas em duas vinhas experimentais com idade semelhante, uma localizada na região

do Douro e outra localizada na região do Dão, durante 2 anos consecutivos (2010 e 2011). Para cada casta, as recolhas foram efetuadas em duplicado.

2.2 - Métodos

Para cada amostra de 200 bagos, foi extraído por esmagamento manual o respetivo mosto, tendo sido diretamente efetuado neste a determinação do teor alcoólico provável, do pH, da acidez total e do ácido tartárico, utilizando-se as metodologias do OIV (2006). Na avaliação da composição fenólica, as amostras foram previamente preparadas de acordo com a metodologia apresentada por CARBONNEAU e CHAMPAGNOL (1993). Nos extratos obtidos, efetuou-se, em duplicado, a determinação dos teores em compostos fenólicos totais (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 1982), antocianinas totais (RIBÉREAU-GAYON e STONESTREET, 1965), compostos fenólicos flavonóides, compostos fenólicos não flavonóides (KRAMLING e SINGLETON, 1969) e a intensidade da cor (OIV, 2006).

2.3 - Tratamento estatístico dos resultados

Para analisar as diferenças estatísticas entre os resultados, efetuou-se uma análise de variância e comparação dos valores médios (ANOVA, uma variável), tendo as diferenças entre os valores médios sido feita com o teste Scheffler ($p < 0.05$). A diferenciação das castas pelos diferentes parâmetros foi efetuada com recurso à análise em componentes principais. O programa usado para o tratamento estatístico foi o Statistica versão 6.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro 1, são apresentados os resultados relativos à caracterização química geral das castas analisadas provenientes das duas regiões consideradas durante os anos de 2010 e 2011. Assim, analisando os resultados apresentados no quadro 1, é possível constatar que para os valores referentes ao teor alcoólico provável, foi notório para os dois anos objeto de estudo, que as castas Pinot Noir, Syrah e Tinta Roriz, apresentaram valores médios significativamente mais elevados nas amostras provenientes da vinha situada na região do Dão. Nas restantes castas, não foi possível constatar uma tendência clara, em função do ano e da região de origem das amostras.

Quadro 1 - Caracterização química geral das castas estudadas nas duas regiões consideradas durante os anos de 2010 e 2011.

Casta/região	Ano	Álcool provável (% v/v)	pH	Acidez total (g/L ac. tartárico)	Ácido tartárico (g/L)
Alicante Bouschet/Douro	2010	16.1±0.0 ^a	2.9±0.0 ^d	6.0±0.1 ¹	3.8±0.0 ^f
	2011	11.8±0.0 ^e	3.4±0.0 ^e	8.7±0.3 ^a	5.3±0.2 ¹
Alicante Bouschet/Dão	2010	12.8±0.0 ^e	2.7±0.0 ^b	6.4±0.0 ^b	3.9±0.0 ^e
	2011	12.1±0.0 ^e	4.1±0.0 ^b	6.2±0.0 ^b	3.4±0.0 ^e
Cabernet Sauvignon/Douro	2010	15.5±0.0 ^e	2.9±0.0 ^d	5.3±0.0 ^f	3.8±0.1 ^f
	2011	12.4±0.0 ^e	3.6±0.0 ^b	8.0±0.4 ^a	5.0±0.0 ^a
Cabernet Sauvignon/Dão	2010	15.1±0.2 ^e	2.3±0.0 ^a	8.3±0.0 ^b	3.6±0.2 ^e
	2011	12.5±0.0 ^f	3.8±0.0 ^b	5.7±0.1 ^b	4.9±0.1 ¹
Merlot/Douro	2010	14.4±0.0 ^f	2.9±0.0 ^d	6.0±0.0 ^b	3.8±0.1 ^f
	2011	11.3±0.0 ^e	3.6±0.0 ^b	3.2±0.0 ^b	4.4±0.0 ^b
Merlot/Dão	2010	13.9±0.0 ^f	2.9±0.0 ^d	5.1±0.0 ^f	1.6±0.0 ^a
	2011	14.2±0.0 ^a	3.7±0.0 ^b	7.3±0.0 ^b	4.6±0.0 ^b
Pinot Noir/Douro	2010	11.7±0.0 ^d	2.9±0.0 ^d	6.7±0.0 ^f	2.5±0.2 ^a
	2011	10.6±0.0 ^e	3.6±0.0 ^b	4.0±0.0 ^d	4.3±0.0 ^b
Pinot Noir/Dão	2010	14.8±0.0 ^a	2.9±0.0 ^d	5.5±0.0 ^f	1.7±0.1 ^a
	2011	14.2±0.0 ^a	4.0±0.0 ^b	5.7±0.0 ^b	4.6±0.2 ¹
Syrah/Douro	2010	11.7±0.0 ^d	3.0±0.0 ^e	5.3±0.0 ^f	2.4±0.1 ^d
	2011	11.0±0.0 ^b	3.4±0.0 ^e	8.4±0.0 ^b	4.6±0.0 ^b
Syrah/Dão	2010	13.2±0.0 ^b	2.8±0.0 ^c	5.6±0.0 ^e	2.3±0.2 ^b
	2011	14.2±0.0 ^a	3.9±0.0 ^b	5.7±0.0 ^b	4.4±0.0 ^b
Touriga Nacional/Douro	2010	13.7±0.0 ^f	3.3±0.0 ^e	3.2±0.0 ^b	2.2±0.0 ^b
	2011	13.5±0.0 ^f	4.2±0.0 ^b	2.6±0.1 ^a	3.7±0.0 ^f
Touriga Nacional/Dão	2010	14.1±0.0 ^f	3.1±0.0 ^f	4.8±0.0 ^b	3.4±0.0 ^e
	2011	12.4±0.0 ^e	3.8±0.0 ^b	4.8±0.0 ^b	3.3±0.0 ^e
Tinta Roriz/Douro	2010	12.7±0.0 ^f	3.2±0.0 ^f	3.8±0.0 ^b	2.2±0.0 ^b
	2011	11.2±0.1 ^c	3.8±0.0 ^b	5.9±0.1 ¹	3.7±0.0 ^f
Tinta Roriz/Dão	2010	14.0±0.0 ^f	2.8±0.0 ^c	6.0±0.0 ^b	3.6±0.5 ^e
	2011	11.5±0.0 ^d	3.4±0.0 ^e	4.7±0.1 ^d	4.1±0.0 ^e

NOTA - Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para cada parâmetro avaliado (teste Scheffler).

Relativamente aos valores de pH, verificou-se que foram obtidos valores médios mais elevados de pH no ano de 2011 (valores de pH entre 3.4 e 4.2) para todas as castas estudadas, independentemente da região de origem das amostras comparativamente ao ano de 2010 (valores de pH entre 2.3 e 3.3).

Na figura 1, são apresentados alguns dos parâmetros fenólicos estudados. No geral os extratos fenólicos das amostras das castas provenientes da região do Dão evidenciaram valores médios significativamente mais elevados de compostos fenólicos totais relativamente aos extratos das mesmas castas, mas provenientes da vinha localizada no Douro. Esta tendência foi no geral observada nos dois anos em análise. No entanto, saliente-se que no caso dos extratos fenólicos das castas nacionais, (Touriga Nacional e Tinta Roriz) ocorreu alguma variabilidade de valores nos dois anos estudados, não tendo existido

uma tendência nítida em função da região de origem. Assim, no caso dos valores em compostos fenólicos totais foram obtidas concentrações médias que variaram entre 628.8 e 2094.2 mg/L nos extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão, enquanto que os extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha do Douro, as concentrações médias variaram entre 571.0 e 1427.9 mg/L.

A nível individual e para os dois anos objeto de estudo, saliente-se que para os extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão, foram as castas Alicante Bouschet, Syrah, Merlot e Tinta Roriz, as que apresentaram valores médios de compostos fenólicos totais mais elevados. No caso da vinha localizada na região do Douro, foram os extratos das castas Alicante Bouschet, Touriga Nacional e Tinta Roriz, as que apresentaram valores médios de compostos fenólicos totais mais elevados, sendo que no caso das duas castas nacionais este facto verificou-se só no ano de 2010.

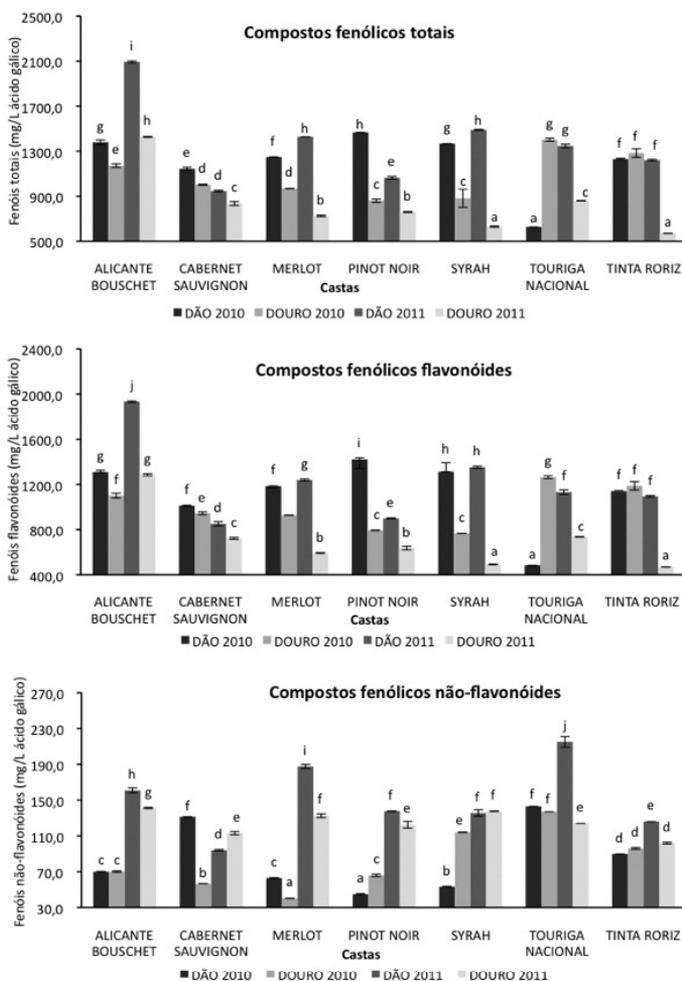
Relativamente aos teores em compostos fenólicos flavonóides, observou-se uma tendência similar ao observado para os teores em compostos fenólicos totais, isto é, valores médios significativamente mais elevados para os extratos fenólicos das amostras recolhidas na vinha localizada na região do Dão. Porém as amostras da casta Touriga Nacional no ano de 2010 constituíram uma exceção a esta tendência, tendo-se quantificado valores médios significativamente mais elevados nas amostras proveniente da vinha localizada na região do Douro (1265.0 mg/L) comparativamente aos valores médios quantificados nas amostras recolhidas na vinha localizada na região do Dão (485.0 mg/L).

Nos teores em compostos fenólicos não flavonóides, obteve-se também no geral valores médios significativamente mais elevados nas amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão, especialmente no ano de 2011. No caso das castas Pinot Noir, Syrah e Tinta Roriz no ano de 2010 e da casta Cabernet Sauvignon no ano de 2011, as amostras provenientes da vinha localizada na região do Douro apresentaram valores médios significativamente mais elevados.

Em termos individuais, os extratos fenólicos da casta Alicante Bouschet, foram os que no geral para ambas as regiões e para os dois anos estudados os que apresentaram valores médios em compostos fenólicos flavonóides mais elevados, enquanto que os extratos

fenólicos da casta Touriga Nacional foram os que no geral apresentaram valores médios de compostos fenólicos não flavonóides mais elevados.

Figura 1 - Teores em compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides das castas estudadas nas duas regiões consideradas durante os anos de 2010 e 2011.

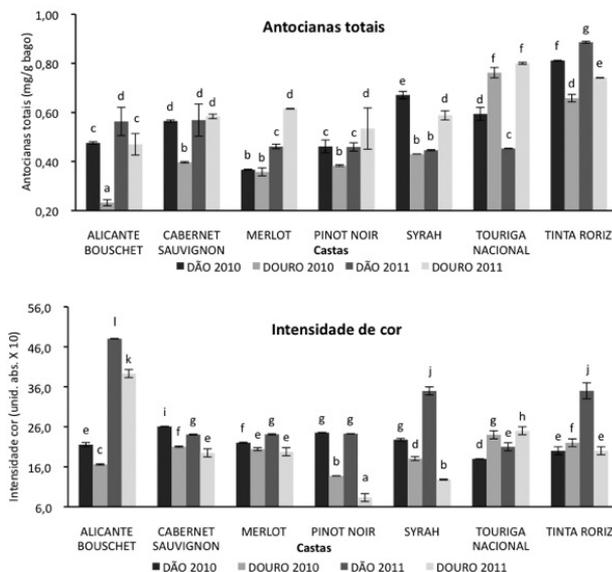


NOTA - Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para cada parâmetro avaliado (teste Scheffler).

Para os teores em antocianinas totais (figura 2), foram também os extratos fenólicos das amostras provenientes da região do Dão, aqueles que apresentaram no geral, valores médios significativamente mais elevados, em ambos os anos. Os valores médios variaram de 0.367 a 0.886 mg/g bago nas amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão, enquanto que os extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha localizada no Douro os valores médios em antocianinas totais variaram de 0.232 a 0.800 mg/g bago.

As castas Merlot, Syrah, no ano de 2011 e a casta Touriga Nacional, em ambos os anos estudados constituíram no entanto uma exceção, tendo apresentado valores médios mais elevados nos extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha localizada na região do Douro. Saliente-se ainda, que foram as amostras das castas de origem nacional, Tinta Roriz (na região do Dão) e Touriga Nacional (na região do Douro), as que evidenciaram valores em antocianinas totais mais elevados.

Figura 2 – Teores em antocianinas totais e valores da intensidade da cor das castas estudadas nas duas regiões consideradas durante os anos de 2010 e 2011.

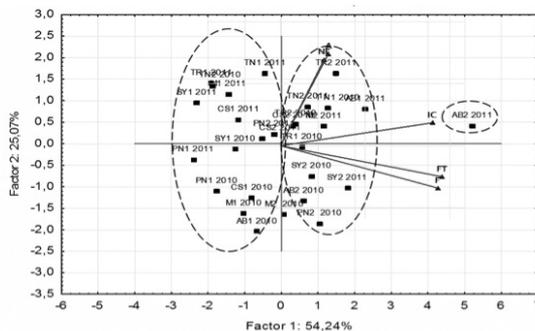


NOTA - Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para cada parâmetro avaliado (teste Scheffler).

Para a intensidade da cor, os resultados apontaram também no geral, em ambos os anos de estudo, para valores médios mais elevados nos extratos fenólicos das amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão (valores médios entre 18.0 e 48.0 unid. abs.), comparativamente aos valores dos extratos fenólicos das mesmas castas mas provenientes da vinha localizada na região do Douro (valores médios entre 8.2 e 39.3 unid. abs.). A casta Touriga Nacional constituiu no entanto a exceção a esta tendência, tendo-se verificado valores médios significativamente mais elevados nos extratos das amostras provenientes da vinha localizada na região do Douro.

De salientar que a variação obtida para os valores da intensidade da cor, nomeadamente dentro da mesma casta, além de refletirem os teores em antocianinas totais, refletem também os valores de pH quantificados nos mostos das diferentes castas.

Figura 3 - Projeção das castas e dos parâmetros fenólicos (anos de 2010 e 2011) no plano definido pelas duas componentes principais.



1- Douro; 2 - Dão. M - Merlot; SY - Syrah; PN - Pinot Noir; AB - Alicante Bouschet; CS - Cabernet Sauvignon; TN - Touriga Nacional; TR - Tinta Roriz; FT - compostos fenólicos totais; F - compostos fenólicos flavonóides; NF - compostos fenólicos não-flavonóides; IC - intensidade de cor; A - antocianinas totais.

A separação das castas provenientes das duas regiões em função da sua composição fenólica foi realizada pela análise em componentes principais (figura 3). Os dois primeiros componentes permitem explicar 79,31% da variação total. A primeira compo-

nente (CP 1 - 54.24 %) está relacionada positivamente com os compostos fenólicos totais, compostos fenólicos flavonóides e intensidade da cor e a segunda componente (CP 2 - 25.07 %) está positivamente relacionada com os compostos fenólicos não flavonóides e antocianas totais.

4 - CONCLUSÕES

Para as castas estudadas e considerando os dois anos objeto de análise, os resultados obtidos apontaram para uma tendência de maior riqueza em compostos fenólicos por parte das amostras provenientes da vinha localizada na região do Dão. Esta tendência, foi especialmente notória no caso dos teores em compostos fenólicos totais e compostos fenólicos flavonóides. Foi no entanto constatado que a casta Touriga Nacional, apresentou um comportamento mais heterogéneo entre as duas regiões e nos dois anos estudados, tendo existido uma tendência para obtenção de valores médios mais elevados em compostos fenolicos totais, flavonóides e antocianas totais nas amostras provenientes da vinha localizada na região do Douro.

Em termos individuais, a casta Alicante Bouschet, foi a que evidenciou valores de compostos fenólicos totais mais elevados, enquanto que as duas castas nacionais estudadas evidenciaram-se positivamente relativamente às castas estrangeiras estudadas através de níveis em antocianas totais mais elevados.

Finalmente, perante os resultados obtidos, parece ocorrer uma tendência para uma maior adaptabilidade das castas estrangeiras estudadas para as condições existentes na região do Dão, relativamente às condições edafoclimáticas existentes na região do Douro. No entanto, no caso das duas castas nacionais estudadas, estas evidenciaram uma tendência menos definida. Porém, convém salientar que estes resultados devem ser encarados como preliminares e reportados às condições existentes nas duas vinhas tidas em consideração e como tal deverá de existir algum cuidado na sua generalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARBONNEAU A., CHAMPAGNOL F. (1993). Nouveaux systèmes des culture intégrale du vignoble. Programme AIR-3-CT93.
- COHEN S.D., TARARA J.M., KENNEDY J.A. (2008). Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Analytica Chimica Acta* 621, 57-67.
- COSME F., RICARDO-DA-SILVA J.M., LAUREANO O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry* 112, 197-204.
- DOPICO-GARCÍA M.S., FIQUE A., GUERRA L., AFONSO J.M., PEREIRA O., VALENTÃO P., ANDRADE P.B., SEABRA R.M. (2008). Principal components of phenolics to characterize red *Vinho Verde* grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds. *Talanta* 75, 1190-1202.
- JORDÃO A.M., RICARDO-DA-SILVA J.M., LAUREANO O. (1998a). Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castelão Francês and Touriga Francesa. *Vitis* 37, 93-94.
- JORDÃO A.M., RICARDO-DA-SILVA J.M., LAUREANO O. (1998b). Influência da rega na composição fenólica das uvas tintas da casta Touriga Francesa (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Food Science* 2, 60-73.
- KRAMLING T.E., SINGLETON, V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 20, 86-92.
- MATEUS N., MACHADO J.M., DE FREITAS V. (2002). Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1689-1695.
- OIV (2006). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et moûts. Ed. Officielle. Paris.
- OLLÉ D., GUIRAUD J.L., SOUQUET J.M., TERRIER N., AGEORGES A., CHEYNIER V., VERRIES C. (2011). Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 90-100.
- PRICE S.F., BREEN P.J., VALLADAO M., WATSON B.T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 187-193.
- RIBÉREAU-GAYON P., PEYNAUD E., SUDRAUD P. (1982). Science et Techniques du vin. Tome 4. Dunod: Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., STRONESTREET E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin Société de Chimie*, 9, 2649-2652.

AVALIAÇÃO DA TEXTURA DE UVAS DE DIFERENTES VARIEDADES

Maria João CABRITA¹; Raquel GARCIA²; Ana Elisa RATO³; Ana Cristina AGULHEIRO SANTOS⁴

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi avaliar as propriedades reológicas de diferentes variedades de uvas para vinificar. Foram estudadas as variedades brancas Síria, Antão Vaz, Perrum, Rabo de Ovelha e Arinto e as variedades tintas Trincadeira, Aragonez, Tinta Caiada, Moreto e Castelão. Para se avaliar da existência ou não de diferenças entre as variedades, foram efectuados testes em 200 bagos de cada variedade, nomeadamente a compressão do bago inteiro e a resistência da película (pericarpo) e da polpa (mesocarpo) à penetração. Um segundo objectivo deste trabalho foi seleccionar os métodos e parâmetros que melhor caracterizam as variedades reologicamente, por forma a reduzir o tempo de análise e simplificar a metodologia de análise.

Foram encontradas diferenças significativas entre as variedades para todos os parâmetros reológicos estudados.

Os valores elevados de firmeza (F) obtidos pela máxima força durante a compressão do bago inteiro, pela máxima força durante o teste de penetração da película, e pela força a 3 mm de deformação da polpa, demonstraram serem bons indicadores para serem usados em trabalhos futuros.

Palavras Chave: uvas, propriedades reológicas

1- INTRODUÇÃO

Os frutos são considerados como corpos com comportamento reológico visco-elástico, quando submetidos a uma carga (ABBOTT, 1999) sendo no caso particular da uva de realçar a componente elástica (BLAHOVEC, 1994). A resistência mecânica dos bagos de uva é um importante parâmetro de qualidade para uvas de mesa, contudo também pode ser interessante do ponto de vista tecnológico. As características texturais de uvas de mesa têm sido alvo de estudos vários, sendo abordada a evolução de parâmetros tex-

ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

¹ mjbc@uevora.pt; ² raquelg@uevora.pt; ³ aerato@uevora.pt; ⁴ acsantos@uevora.pt

turais em função do estado de maturação das uvas (ROBIN *et al.*, 1997; Le MOIGNE *et al.*, 2008; LETAIEF *et al.*, 2008).

O estudo das propriedades reológicas de uvas de variedades para vinificar poderá fornecer informações úteis, específicas de cada variedade, que sejam interessantes para o estabelecimento de alternativas tecnológicas.

Para a avaliação da textura pode-se recorrer a técnicas analíticas de rápida execução, baixo custo e facilmente repetíveis, com o objectivo de monitorizar a qualidade da uva, visto permitirem inferir sobre a extractabilidade das antocianinas (RÍO SEGADE *et al.* 2008b). Estes autores estudaram a influência do estado de maturação e da proveniência de uvas Cabernet Franc nas suas características de textura e correlacionaram estes dados com índices de maturação fenólica e tecnológica, tendo concluído que a força de ruptura e o gradiente obtido por Força/ Deformação observados durante os testes de penetrometria apresentavam-se correlacionados com a extractabilidade das antocianinas. Outros autores correlacionaram as propriedades de textura das uvas com a extractabilidade dos compostos fenólicos das películas e das grainhas (Le MOIGNE *et al.* 2008, RÍO SEGADE *et al.* 2008b, ROLLE *et al.* 2008). Mais tarde em 2010, TORCHIO *et al.* afirmaram que o índice de extractabilidade de antocianinas e as propriedades mecânicas da película dos bagos é muito influenciada pelas características do terroir e menos pela concentração de açúcares, e recentemente ZOUID *et al.* (2011) confirmam teorias anteriormente apresentadas que afirmam que os valores de firmeza da película dos bagos estão bem correlacionados com o conteúdo em sólidos solúveis das uvas.

As características texturais das uvas parecem ser dependentes da variedade (SATO *et al.*, 1997) e de factores edafo-climáticos que afectam os processos de maturação das uvas (SATO *et al.*, 2000). RÍO SEGADE *et al.* (2008a), constataram que alguns parâmetros de textura, força de ruptura da película e energia necessária, permitem a caracterização e distinção entre 13 variedades tintas da Galiza. LETAIEF *et al.* (2008) em estudos realizados com Barbera, Brachetto, Cabernet Sauvignon, Dolcetto, Freisa, Nebbiolo e Pinot Noir também reconheceram que algumas características de textura poderiam ser utilizadas para distinguir as variedades. PORRO *et al.* (2010) constatou que o stress hídrico e aspectos de nutrição das vinhas são determinantes nas características texturais dos bagos, mais especificamente na espessura das películas.

Do ponto de vista metodológico, há alguns aspectos que convem ressaltar. Os conhecimentos fundamentais de reologia permitem afirmar que não é possível converter ou comparar medições obtidas com diferentes sondas (ABBOTT 1999; ROUDOT, 2006). A informação sobre a sonda a utilizar é muito diversa, sendo a sonda cilíndrica de 2mm de diâmetro utilizada por varios autores, nomeadamente por VARGAS *et al.* (2000). Acresce o facto da dimensão da amostra não ter sido até agora bem definida, sendo que SATO *et al.* (2004) usaram amostras de 5 bagos, enquanto Le MOIGNE *et al.* (2008) usaram amostras de 50 bagos. ROLLE *et al.* (2008) afirmaram que 20 bagos são suficientes para uma análise estatística adequada e que a localização dos bagos no cacho não afecta a firmeza da película.

O teste de compressão, definido pelo facto da sonda ser de maior dimensão que o maior diâmetro da amostra, pode conduzir a deformações tais que seja um teste de carácter destrutivo ou pelo contrário pode não causar dano no bago, tal como referido por GROTTTE *et al.* (2001). Este tipo de teste com fruto inteiro reflecte as propriedades quer da polpa quer da película mas não existe consenso entre os vários autores sobre o que deve ser considerado como medida de firmeza no teste de compressão: BELLINCON-TRO *et al.* (2009) definem firmeza como a deformação (mm) quando é exercida uma força de 1 N; CEFOLA *et al.* (2011) definem firmeza como a força (N) necessária para que se verifiquem 5 mm de deformação.

A área sob a curva Força/Deformação em testes de penetração, até ao ponto de ruptura da película, considerada como energia ou trabalho, também tem sido usada como indicador da resistência (RÍO SEGADE *et al.*, 2008a). SATO *et al.* (1997, 2004), realizaram vários testes de penetração com sonda cilíndrica de base plana com 3 mm para avaliação unicamente da polpa e mediram a força máxima, deformação e a área abaixo da curva força/deformação designando-a por trabalho.

As condições de realização dos testes são também muito diversas, contudo a velocidade do teste é bastante consensual, tendo sido usada a velocidade de 1 mm s⁻¹ por autores como VARGAS *et al.*, (2000), RÍO SEGADE *et al.*, (2008a) e ROLLE *et al.*, (2009).

O objectivo inicial deste trabalho foi avaliar as propriedades reológicas/ textura de diferentes variedades de uvas. Contudo um segundo objectivo, não menos importante, foi seleccionar os métodos de avaliação de textura e os parâmetros que melhor caracterizam

as variedades por forma a reduzir o tempo de análise, simplificar a metodologia de análise e permitir o seu uso sistematizado.

MATERIAL E MÉTODOS

As uvas estudadas foram das variedades Siria, Antão Vaz, Perrum, Rabo de Ovelha, Arinto, Trincadeira, Aragonez, Tinta Caiada, Moreto e Periquita, colhidas à maturação. De cada variedade foram amostrados 50 bagos para avaliação das propriedades reológicas mediante ¹⁾testes de compressão para medição da firmeza do bago inteiro, ²⁾testes de penetração para avaliação da película e da polpa de bagos inteiros e ³⁾testes de penetração para avaliação da polpa em bagos inteiros aos quais era previamente retirada a película.

Todos os testes foram realizados com recurso a um texturómetro Analyser TA-HDi, da Stable Microsystems, equipado com uma célula de carga de 25Kg, e software “Texture Analyser”. Para a realização dos testes de compressão foi usada a sonda de base plana com 10cm de diâmetro. A compressão foi realizada na parte lateral do bago inteiro, tal como indicado por LETAIEF *et al.* (2008). Foi registado o gráfico Força/Deformação e os parâmetros medidos foram: a força máxima (MF bago), a força a 2 mm (F2 bago), a força máxima de deformação (D bago) e o correspondente gradiente (F/D bago). Neste estudo estudaram-se diversos parâmetros, considerando que um dos objectivos deste trabalho é a definição objectiva de firmeza no teste de compressão. Para a realização dos testes de penetração, foi usada uma sonda cilíndrica de aço de base plana com 2 mm de diâmetro (ROLLE *et al.*, 2009) e o teste conduzido até à máxima deformação a 7mm. Cada teste foi efectuado duas vezes em cada bago inteiro. Os parâmetros medidos foram: a firmeza da película (MF pel.), a deformação (D pel.) e foi calculado o rácio MF/DMF pel. que de acordo com vários autores pode ser considerado como uma aproximação ao Módulo de Young se a curva força/tempo ou força/deformação for aproximadamente linear (LETAIEF *et al.* 2008).

Aos bagos sem películas foram medidos os seguintes parâmetros: a firmeza da polpa a 3 mm (F3mm polpa) e a 5 mm (F5mm polpa), a firmeza média entre estes dois pontos (M polpa) e a área da polpa entre 3 e 5 mm (A polpa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão dos parâmetros medidos apresentam-se as representações das curvas força/deformação para os testes realizados (figura 1): Compressão de fruto inteiro com sonda de 10cm (1), penetração com sonda de 2mm em bago inteiro (2) e penetração com sonda de 2mm em bago sem película (3).

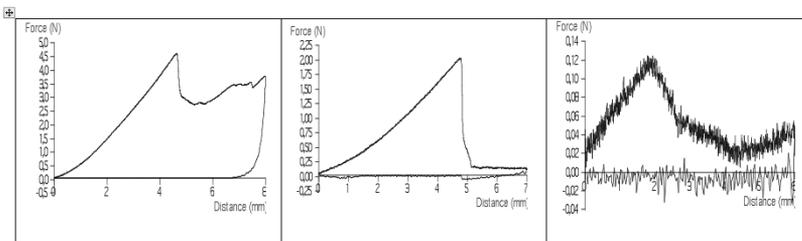


Figura 1 - Curvas Força/Deformação obtidas em testes de compressão com sonda de 10cm, (1), penetração dos bagos inteiros com sonda de 2mm (2) e penetração dos bagos sem película (3).

Apresentam-se na tabela 1 e 2 os resultados obtidos para alguns dos parâmetros de textura em avaliação, seleccionados após um estudo alargado a todos os parâmetros medidos durante este estudo.

Tabela 1 – Parâmetros reológicos das diferentes variedades tintas

		Aragonez	Moreto	Periquita	Tinta Caiada	Trincadeira
Teste compressão	MF bago (N)	4.04±1.33 c	4.52±1.37 cd	13.44±2.85 a	5.16±1.03 d	7.79±2.24 b
	F/D bago(N)	1.01±0.20 a	1.10±0.17 a	2.21±0.33 b	1.10±0.19 a	1.63±0.39 c
Teste penetração bago inteiro	MF pel.(N)	2.06±0.52 b	2.60±0.61 a	5.00±0.67 c	2.94±0.65 a	3.84±0.67 d
	MF/DMF (Nmm ⁻¹)	0.53±0.13 a	0.64±0.07 b	0.94±0.13 c	0.50±0.10 a	0.78±0.19 d
Teste penetração polpa	A polpa (Nmm)	0.38±0.16 b	0.22±0.06 a	0.94±0.13 c	0.22±0.07 a	0.54±0.27 d

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas no teste múltiplo de comparação de médias, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 2 – Parâmetros reológicos das diferentes variedades brancas

		Antão Vaz	Arinto	Perrum	Rabo de Ovelha	Siria
Teste compressão	MF bago (N)	6,93±1,80 b	7,02±1,59 b	4,70±1,04 a	6,89±1,60 b	8,57±1,64 c
	F/D bago (Nmm ⁻¹)	1,30±0,26 b	1,50±0,33 c	0,97±0,14 a	1,43±0,28 bc	1,42±0,22 bc
Teste penetração bago inteiro	MF pel.(N)	2,67±0,59 a	4,09±0,92 b	2,54±0,63 a	3,76±0,79 b	2,69±0,39 a
	MF/DMF (Nmm ⁻¹)	0,51±0,08 a	0,72±0,12 b	0,52±0,06 a	0,74±0,20 b	0,54±0,07 a
Teste penetração polpa	A polpa (Nmm)	0,32±0,06 b	0,20±0,06 a	0,14±0,05 a	0,31±0,23 b	0,33±0,12 b

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas no teste múltiplo de comparação de médias, para um nível de confiança de 95%.

A observação dos valores permitem-nos afirmar que de entre as variedades tintas, as uvas das castas Periquita e Trincadeira apresentaram sempre valores significativamente diferentes das restantes variedades, sendo a casta Periquita a que apresenta os valores mais elevados logo seguida da casta Trincadeira. De acordo com ZOUID *et al.* (2008, 2011), os parâmetros texturais das uvas variam com o estado de maturação. As uvas das castas tintas em estudo apresentaram teores de álcool provável muito semelhante (cerca de 12,5 % (v/v)) com exceção da casta Moreto que apresentou um teor em álcool provável de 10 % (v/v). Já no caso das uvas brancas podemos observar que a casta Perrum foi a que apresentou valores genericamente mais baixos nos diversos parâmetros em estudo. Foi também a casta que apresentou um teor em álcool provável mais baixo (12,5 % (v/v)).

Os elevados valores de F encontrados para as medições da firmeza do bago, obtidos através da máxima força de compressão do bago inteiro (MF bago) e da máxima força durante o teste de penetração de película (MF pel.) e a força a 3 mm de deformação da polpa (F3 polpa) são indicativos de poderem ser usados em trabalhos futuros. A realização de testes de compressão revelou-se de fácil execução, o que permite realizar grande número de amostras, contudo há que prestar especial atenção ao facto de alguns exemplares não apresentarem ruptura, o que exige maior acuidade na obtenção dos parâmetros a partir dos gráficos.

A dificuldade de execução do teste de avaliação da polpa depois de retirada a película,

o que torna a preparação da amostra muito morosa, leva-nos a não o recomendar. Acresce que para se utilizar um valor de trigger elevado perde-se a sensibilidade necessária para valores da ordem de grandeza destes (entre 0,14 e 0,94 N), por outro lado baixando o valor do trigger obtemos gráficos com muito “ruído” como aconteceu neste trabalho.

O teste de penetração de fruto inteiro parece ser bastante promissor, já que permite a aproximação teórica ao coeficiente de elasticidade e fornece informação sobre a película, elemento histológico fundamental para a estrutura dos “soft fruits”, bem como da polpa. Alguns autores como Le MOIGNE *et al.* (2008), afirmam que é essencial trabalhar sempre com valores médios quando se trata de resultados de teste de compressão e nunca considerar cada bago isoladamente, generalizando esta recomendação a todos os testes de avaliação de parâmetros reológicos. Note-se que nestes estudos de propriedades reológicas, como noutros realizados noutros frutos, é sempre encontrada uma elevada variabilidade entre os frutos.

Para definir o real interesse das avaliações de textura recomendam-se estudos aprofundados sobre as correlações entre testes instrumentais de medida de textura e a composição química quantitativa, usando índices habitualmente usados em enologia

CONCLUSÕES

A utilização de testes de avaliação de propriedades reológicas de uva para vinificar permite discriminar as diferentes variedades em estudo.

Recomenda-se em futuros trabalhos o teste de compressão de fruto inteiro e de penetração, ambos com sensibilidade necessária, neste caso, para distinguir variedades. Aponta-se como muito adequado o teste de penetração com sonda de cilíndrica de 2mm de diâmetro, a uma velocidade de 1mms^{-1} , sendo a amostra colocada lateralmente no prato e a introdução da sonda no diâmetro equatorial. Os parâmetros com maior potencial para discriminação seria a força máxima alcançada e o rácio força por deformação, que pode ser considerado como uma aproximação ao coeficiente de elasticidade, desde que se verifique a condição de linearidade da curva até alcançar a força máxima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, J. A. 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 207-225.
- BELLINCONTRO, A., I. NICOLETTI, M. VALENTINI, A. TOMAS, D. DE SANTIS, D. CORRADINI, e F. MENCARELLI. 2009. Integration of nondestructive techniques with destructive analyses to study postharvest water stress of winegrapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 60: 57-65.
- BLAHOVEC, J. 1994. Elastic and strength properties of round agricultural products. *Int. Agrophysics* 8: 543-546.
- CEFOLA, M., PACE, B., BUTTARO, D., SANTAMARIA, P., e SERIO, F. 2011. Postharvest evaluation of soilless-grown table grape during storage in modified atmosphere. *J. Sci. Food Agric.* 91: 2153-2159.
- GROTTE, M., Y. CADOT, A. POUSSIER, D. LOONIS, E. PIETRI, F. DUPRAT, e G. BARBEAU. 2001. Determination of the maturity status of grape berry (*Vitis vinifera*) from physical measurement: Methodology. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 35: 87-98.
- Le MOIGNE, M., MAURY, CH., BERTRAND, D., e JOURJON, F. 2008. Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference*, 19: 220 e 231.
- LETAIEF, H., ROLLE, L., ZEPPA, G., e GERBI, V. 2008. Assessment of grape skin hardness by a puncture test. *J. Sci. Food Agric.* 88: 1567 e 1575.
- PORRO, D., RAMPONI, M., TOMASI, T., ROLLE, L., e PONI, S. 2010. Nutritional implications of water stress in grapevine and modifications of mechanical properties of berries. *Acta Hort.* 868:73-80.
- RÍO SEGADE, S., ROLLE, L., GERBI, V., e ORRIOLS, I. 2008a. Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. *J. Food Composition and Analysis*, 21: 644-649.
- RÍO SEGADE, S., SOTO VÁZQUEZ, E., e DÍAZ LOSADA, E. 2008b. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in diferente cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 599-607.
- ROBIN, J.P., ABBAL, P., e SALMON, J.M. 1997. Fermeté et maturation du raisin. Définition et évolution de différents paramètres rhéologiques au cours de la maturation. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 31: 127-138.
- ROLLE, L., TORCHIO, F., ZEPPA, G., e GERBI, V. 2008. Anthocyanin extractability assessment of grape skins by texture analysis. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 42: 157-162.
- ROLLE, L., TORCHIO, F., ZEPPA, G., GERBI, V. 2009. Relations between break skin force and anthocyanin extractability at different stages of ripening. *Am. J. Enol.Vitic.* 60: 93-97.
- ROUDOT, A.C. 2006. Some considerations for a theory of plant tissue mechanics. *Science of Aliments* 6: 409-426.

- SATO, A., YAMADA, M., HIROSHI, I., e HIRAKAWA, N. 2000. Optimal spatial and temporal measurement repetition for reducing environmental variation of berry traits in grape breeding. *Sci. Hort.* 85: 75-83.
- SATO, A., YAMADA, M., IWANAMI, H., e MITANI, N. 2004. Quantitative and instrumental measurements of grape flesh texture as affected by gibberellic acid application. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73:7-11.
- SATO, A., YAMANE, H., HIRAKAWA, N., OTOBE, K., YAMADA, M. 1997. Varietals differences in the texture of grape berries measured by penetration tests. *Vitis* 36: 7-10.
- TORCHIO, F., CAGNASSO, E., GERBI, V., e ROLLE, L. 2010. Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta.* 660: 183-189.
- VARGAS, A., PEREZ, J., PABLO, J., ZOFFOLI, PEREZ, A. 2000; Evolucion de la textura de bayas de uva del cv. Thompson seedless. Evolution of the texture in Thompson seedless berries. *Ciencia e Investigacion Agraria*
- ZOUID, I. 2011. Etude de l'évolution et de l'extractibilité des composés phénoliques du raisin en milieu hydroalcoolique pendant la maturation – lien avec les propriétés mécaniques de la baie. Thesis, Ecole Supérieure d'Agriculture d'Angers, UMT Vinitera, Unité de Recherche GRAPPE, France.
- ZOUID, I., SIRET, R., MAURY, C., LETAIEF, H., e JOURJON, F. 2008. Variación de la textura de las uvas Cabernet Franc durante la maduración. Correlación con la extratibilidad de los compuestos fenólicos. *Comunicação oral OIV 2008.*

EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE VINHOS CV TOURIGA NACIONAL E TRINCADEIRA DE COLAGEM COM PROTEÍNAS VEGETAIS

Ana Cristina ROMÃO¹; Jorge RICARDO-DA-SILVA¹; Olga LAUREANO¹

Resumo: A colagem proteica é uma operação complexa que visa a clarificação e particularmente a redução da adstringência dos vinhos. As colas proteicas utilizadas em Enologia apresentam uma composição físico-química variada, em que o tipo de proteína, a distribuição da massa molecular e a densidade de carga de superfície influenciam as propriedades da cola. O presente trabalho estudou o efeito de colas proteicas não-tradicionais de origem vegetal na composição físico-química dos vinhos, nomeadamente nos parâmetros da cor e perfil antociânico. Em todas as colas utilizadas, comprovou-se uma diminuição na intensidade da cor, antocianinas totais, antocianinas coradas e taninos, embora com menor decréscimo nas não-tradicionais do que nos vinhos colados com bentonite e ovalbumina. Os resultados deste estudo demonstraram que as colas não convencionais traduzem num decréscimo percentual menos acentuado nos parâmetros da cor que o obtido com a albumina de ovo. Em relação ao perfil antociânico verificou-se uma diminuição da concentração de antocianinas, em particular das antocianinas aciladas nas colas não tradicionais produzidas à base de proteína de ervilha e extracto de levedura.

Palavras-chave: Touriga Nacional, Trincadeira, antocianinas, proteínas vegetais, extrato de levedura, HPLC.

1 - INTRODUÇÃO

A colagem é uma prática enológica antiga que tem por objectivo obter a clarificação do vinho, através da eliminação de partículas responsáveis pela turvação que contribui para melhorar a sua limpidez, obtendo-se em simultâneo um efeito positivo na estabilização e nas características organolépticas, particularmente nas gustativas.

No mercado de produtos enológicos existe uma grande diversidade de produtos para a

¹ Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Laboratório de Enologia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa Codex, Portugal. Email: acromao@hotmail.com; jricardosil@isa.utl.pt; olgalaureano@ia.utl.pt

colagem do vinho, estando as gelatinas (proteínas de origem animal) largamente difundidas no sector vitivinícola. Ao longo dos últimos anos e depois do surgimento da BSE (Encefalopatia Espongiforme Bovina) deixou-se de usar a gelatina extraída por hidrólise parcial a partir do colagénio dos ossos, pele e tecido conjuntivo de animais (como os bovinos). Na Europa, foi interdito o uso de plasma bovino ou células de sangue na colagem. A resolução OENO 7/99 (OIV, 1999) modificou a ficha “Colagem” do Código Internacional de práticas enológicas, referente a vinhos, proibindo a utilização “albumina de sangue”. Durante a primeira década deste século e com a necessidade de encontrar produtos alternativos aos de origem animal, estudou-se a aplicabilidade das proteínas vegetais para a colagem de vinho, visto estas serem já muito utilizadas na indústria alimentar como auxiliares tecnológicos. Foram feitos estudos e ensaios de colagem com diversas proteínas vegetais, como a de trigo, ervilha, arroz, tremoço e soja, verificando-se em algumas delas resultados bastante satisfatórios (Lefebvre *et al.* 2000 e 2002; Mira, 2004). As diversas empresas produtoras de produtos enológicos adaptaram esses estudos e fabricaram colas proteicas vegetais que hoje são utilizadas pelos vitivinicultores. Em 2003, o grupo de peritos em Segurança Alimentar do OIV, em resposta a uma solicitação do grupo de peritos em Tecnologia do vinho, emitiu um parecer favorável à utilização de proteínas vegetais na colagem de mostos e vinhos, para a dose máxima de 50 g.hL⁻¹. A resolução OENO 28/2004 (OIV, 2004) menciona a introdução no *Codex Enológico Internacional*, da monografia sobre “Matérias proteicas de origem vegetal derivadas do trigo e da ervilha”. Nos últimos anos foram introduzidos nos produtos de colagem, as leveduras (cápsulas) que associadas a uma proteína vegetal (ervilha) ou em isolado, produzem resultados interessantes nos vinhos, tornando-os mais macios e redondos de boca. No caso das colas produzidas à base de extracto de levedura, o seu uso é relativamente recente. As leveduras são usadas, tradicionalmente, para melhor controlar todo o processo fermentativo, na produção de compostos aromáticos, terpenos, tiois e fenóis voláteis. A partir dessas utilizações concluiu-se que a aplicação de leveduras no vinho trazia algumas melhorias sensoriais, como a sensação de aveludado (Delfini *et al.* 2001). O objectivo principal deste estudo foi verificar a influência das colas de origem proteica vegetal e microbiológica na composição antociânica do vinho, comparando com uma cola mineral e com uma outra de origem vegetal animal.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os vinhos utilizados neste trabalho correspondem à vindima de 2011 de duas castas existentes na Tapada da Ajuda, a Trincadeira (Tr) e a Touriga Nacional (TN). As colas usadas são comerciais cedidas pela Enartis (Plantis–feita à base de proteína de ervilha – E; Pluxbenton N–feita à base de bentonite -Bent), pela AEB Group (Ve-Gel–feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura–E+L), pela Ecofiltra (Biolees–feita à base de envelopes celulares de leveduras-L), pela Proenol (Ovocol Pó–feita à base de albumina de ovo atomizada-Alb). Os ensaios foram realizados em separado, sendo que, em cada semana, se ensaiava uma cola em duas concentrações (C1- concentração mais baixa e C2-concentração mais elevada), feitas em duplicado, com a excepção do ensaio em branco, para as duas castas. Procedeu-se à determinação dos parâmetros da cor e aos cromatogramas.

2.1 - Determinações Analíticas

2.1.1 - Caracterização Geral

As análises químicas foram efectuadas no Laboratório de Enologia do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Numa primeira fase, determinou-se os parâmetros base de caracterização de um vinho (Massa Volúmica, Acidez Volátil, Acidez total, pH, Teor alcoólico volumétrico, Anidrido Sulfuroso livre, Anidrido Sulfuroso total, Anidrido Sulfuroso combinado e Turbidez. Métodos descritos pelo OIV (OIV, 1990)).

2.1.2 - Determinações Específicas

Neste ensaio realizaram-se as seguintes determinações aos vinhos de todas as modalidades: Composição Fenólica: Caracterização da cor - Intensidade da Cor e Tonalidade da Cor, Método descrito pelo OIV (OIV, 1990). Pigmentos Poliméricos, Pigmentos Totais e Índice de Polimerização dos Pigmentos, Antocianinas Totais, Antocianinas Coradas, estas determinações baseiam-se no método proposto por Somers e Evans (1977) e quantificação dos Taninos condensados totais por precipitação com metil celulose metodologia descrita por Sarneckis *et al.* (2006). Apresentam-se os resultados nos quadros 1 e 2. Doseamento de Antocianinas monoméricas por HPLC nas condições descritas por Dallas e Laureano (1994). Todas as determinações foram efectuadas em duplicado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que turbidez tem tendência a decrescer com a aplicação das colas vegetais. No caso das colas Alb e Bent, a turbidez média diminui com a aplicação das colas em ambas as castas, verificando-se também para a cola E onde o valor médio reduz ligeiramente para a casta Trincadeira. Para esta casta, as colas com extracto de levedura na sua composição (E+L e L) comprovou-se um ligeiro aumento dos valores médios de turbidez, que poderá ser explicada pela natureza da cola produzida à base de cápsulas ou extracto de levedura, com menor capacidade de aumentar a limpidez do vinho, principalmente, ao fim dos sete dias do ensaio. Observou-se que a Intensidade da Cor e em todas as colas usadas, para esta casta apresenta um ligeiro decréscimo, com a excepção da cola produzida à base de proteína de ervilha e cápsulas de levedura para a C1 (E+L). Na casta Touriga Nacional e para a Intensidade de Cor constatou-se um decréscimo com a aplicação das colas, principalmente, na albumina de ovo. A Tonalidade da cor tem um ligeiro aumento, com a excepção da cola produzida à base de levedura onde se verificou o inverso, na concentração mais alta. Os resultados obtidos nestes ensaios estão de acordo com os publicados por outros autores (Iturmendi *et al.*, 2010; Mira *et al.*, 2006). Iturmendi *et al.* (2010) que fizeram ensaios com extractos de levedura combinados com bentonite verificando que a redução da Intensidade e Tonalidade da Cor eram menos acentuados do que noutras colas usadas como a gelatina. No ensaio por nós efectuado verificou-se uma tendência para um menor efeito na diminuição da Intensidade da cor nas colas não tradicionais em relação à cola proteica clássica (de origem animal). A percentagem de decréscimo é mais elevada na albumina de ovo do que nas colas não tradicionais como a produzida à base de envelopes celulares de levedura (L) ou a feita à base de proteína de ervilha (E). Os Pigmentos Totais, e os Pigmentos Polimerizados também decresceram com a aplicação das colas, sendo a Bentonite a cola que provoca nos Pigmentos Totais uma redução é mais acentuada. As colas proteicas demonstram uma actuação menos agressiva para os parâmetros da cor do vinho que a bentonite. Contudo nos Pigmentos Poliméricos e para a bentonite não há qualquer alteração, verificando-se uma redução nas restantes colas proteicas, nos dois vinhos estudados. A albumina de ovo reduz menos os pigmentos totais do que as colas não tradicionais, para a casta Trincadeira verificando-se o inverso na casta Touriga Nacional.

Quadro 1 - Resultados obtidos nos parâmetros da cor e taninos para a casta Trincadeira, comparando com as diferentes colas usadas.

C	G	Intensidade			Tonalidade			Pigmentos Totais			Pigmentos Polimerizados			Antocianinas Totais (mg/L)			Antocianinas Coradas (mg/L)			Taninos(g/l)		
			SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D
L	T	14,6	0,01		0,68	0,002		31,3	0,00		5,0	0,01		459	0,2		54	0,4		1,5	0,06	
	C1	14,4	0,09	-2%	0,68	0,002	0%	31,2	0,07	0%	4,6	0,01	-8%	469	1,0	2%	58	0,3	8%	1,4	0,51	-7%
	C2	14,2	0,12	-3%	0,68	0,002	0%	30,5	0,21	-3%	4,6	0,16	-8%	457	9,7	-1%	57	2,0	6%	1,5	0,12	1%
E	T	14,2	0,72		0,69	0,022		34,0	1,14		4,4	0,55		536	41,2		62	1,4		1,6	0,20	
	C1	13,7	0,30	-4%	0,69	0,028	1%	32,6	0,07	-4%	4,1	0,16	-5%	516	3,8	-4%	60	4,8	-2%	1,5	0,17	-10%
	C2	13,4	0,35	-6%	0,69	0,024	0%	32,1	0,00	-6%	4,1	0,30	-6%	505	10,1	-6%	58	0,8	-6%	1,3	0,15	-18%
E+L	T	13,5	0,23		0,68	0,003		23,2	0,57		4,4	0,00		318	11,4		54	2,1		1,3	0,03	
	C1	13,7	0,11	2%	0,69	0,003	1%	22,4	1,14	-3%	4,5	0,28	2%	298	13,4	-6%	53	4,2	-1%	1,4	0,10	8%
	C2	13,4	0,31	-1%	0,69	0,010	2%	22,4	0,79	-4%	4,4	0,02	-1%	303	15,0	-5%	53	0,6	-2%	1,0	0,23	-22%
Alb	T	14,5	0,41		0,68	0,019		24,0	1,21		3,8	0,04		354	25,7		76	6,9		1,2	0,27	
	C1	13,7	0,39	-6%	0,71	0,015	3%	22,8	0,36	-5%	3,7	0,02	-3%	333	6,4	-6%	69	0,7	-10%	1,4	0,09	10%
	C2	13,5	0,18	-6%	0,71	0,016	4%	23,3	0,21	-3%	3,7	0,01	-2%	344	4,0	-3%	66	3,5	-14%	1,2	0,14	-8%
Bent	T	16,1	0,20		0,66	0,004		26,3	0,64		4,0	0,07		393	15,2		92	1,7		2,4	0,17	
	C1	15,5	0,40	-4%	0,69	0,014	4%	24,5	0,50	-7%	4,0	0,20	0%	356	16,6	-9%	82	3,4	-11%	1,3	0,12	-40%
	C2	15,3	0,37	-5%	0,68	0,012	3%	23,2	0,86	-12%	4,0	0,09	0%	330	14,1	-16%	81	1,3	-12%	1,5	0,35	-35%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa;

C2–concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb– cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

No que se refere as antocianinas coradas comprovou-se que a albumina retira mais antocianinas do que as colas não tradicionais, como a cola feita à base de envelopes celulares de leveduras (L) e a cola feita à base de proteína de ervilha (E), sendo este efeito mais evidente na Touriga Nacional que na Trincadeira. Estes resultados são concordantes com os obtidos para a intensidade da cor. Nas antocianinas totais não se observam diferenças entre as duas castas e para as colas ensaiadas. Os resultados obtidos neste ensaio são semelhantes aos obtidos em ensaios de outros autores que usaram colas proteicas de origem vegetal e produzidas à base de extracto de levedura. (Mira *et al.*, 2006; Iturmendi *et al.*, 2010. Assim verificou-se que todos os parâmetros relacionados com a cor decrescem com a aplicação de todas as colas ensaiadas, principalmente, no caso da bentonite e da albumina de ovo, que induzem um decréscimo mais acentuado. É no caso dos Taninos onde esse decréscimo é mais acentuado como verificado por outros autores (Mira *et al.* (2006) Iturmendi *et al.* (2010) e Cosme *et al.* (2009)). Na casta Touriga Nacional e para as colas proteicas vegetais, o decréscimo ronda os 28% sendo para a Trincadeira

na ordem dos 12%. No caso da cola mineral usada constatou-se um comportamento antagónico, onde na casta Trincadeira a redução tem valores na ordem dos 38% e na Touriga Nacional apenas se verificou um decréscimo de cerca de 10%.

Quadro 2 - Resultados obtidos nos parâmetros da cor e taninos para a casta Touriga Nacional, comparando com as diferentes colas usadas.

Casta	Cola	Intensidade			Tonalidade			Pigmentos Totais			Pigmentos Polimerizados			Antocianinas Totais (mg/L)			Antocianinas Coradas (mg/L)			Taninos (g/g)		
			SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D		SD	% D
L	T	7,64	0,311		0,78	0,026		26,9	1,07		2,2	0,01		538	21,4		30	3,8		1,7	0,02	
	C1	7,72	0,102	1%	0,77	0,008	0%	26,2	1,00	-3%	2,2	0,03	-1%	524	20,0	-3%	31	2,3	4%	1,2	0,11	-25%
	C2	7,59	0,114	-1%	0,77	0,016	1%	25,5	0,90	-5%	2,2	0,07	-2%	511	0,0	-5%	31	0,8	2%	1,2	0,08	-26%
E	T	9,25	0,290		0,69	0,022		26,3	1,14		2,5	0,55		536	41,2		62	1,4		1,3	0,20	
	C1	8,99	0,429	-3%	0,69	0,028	1%	26,3	0,97	0%	2,5	0,16	0%	516	3,8	-4%	60	4,8	-2%	0,8	0,83	-32%
	C2	8,75	0,440	-5%	0,69	0,024	0%	25,8	0,90	-2%	2,4	0,30	-4%	505	10,1	-6%	58	0,8	-6%	0,7	0,32	-45%
E+L	T	10,30	0,255		0,68	0,003		18,4	0,57		2,7	0,00		318	11,4		54	2,1		1,6	0,13	
	C1	10,29	0,185	0%	0,69	0,003	1%	17,7	1,14	-4%	2,8	0,28	4%	298	13,4	-6%	53	4,2	-1%	1,2	0,36	-23%
	C2	10,30	0,180	0%	0,69	0,010	2%	17,3	0,79	-6%	3,0	0,02	11%	303	15,0	-5%	53	0,6	-2%	1,3	0,20	-16%
Alb	T	11,19	0,311		0,68	0,019		20,4	1,21		2,6	0,04		354	25,7		76	6,9		1,8	0,05	
	C1	10,27	0,575	-8%	0,71	0,015	3%	18,7	0,36	-8%	2,5	0,02	-4%	333	6,4	-6%	69	0,7	-10%	1,5	0,13	-13%
	C2	9,67	0,190	14%	0,71	0,016	4%	18,5	0,21	-9%	2,4	0,01	-8%	344	4,1	-3%	66	3,5	-14%	2,0	0,22	11%
Bent	T	11,68	0,028		0,66	0,004		19,1	0,64		2,9	0,07		393	15,2		92	1,7		1,6	0,10	
	C1	11,50	0,090	-2%	0,69	0,014	4%	18,0	0,50	-6%	3,0	0,20	3%	356	16,6	-9%	82	3,4	-11%	1,3	0,09	-13%
	C2	11,39	0,092	-2%	0,68	0,012	3%	18,7	0,86	-2%	3,0	0,09	3%	330	14,1	-16%	81	1,3	-12%	1,3	0,11	-6%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Os resultados referentes às antocianinas monoméricas são apresentados nos quadros 3 a 7. Em todos os ensaios se observou um decréscimo na concentração, nas antocianinas, esperado pelos resultados obtidos nos parâmetros físico-químicos da cor (intensidade da cor, antocianinas totais, antocianinas coradas). Verificou-se que o decréscimo é mais expressivo nas antocianinas acetiladas e cumariladas. Contudo, em algumas colas observou-se comportamentos diferentes nas duas castas estudadas. Na cola L existindo um decréscimo mais pronunciado nas acetiladas para a casta Trincadeira verificando-se que na Touriga Nacional é mais acentuado nas cumariladas.

Quadro 3 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 7 dias de colagem

Cola L	Trincadeira									Touriga Nacional								
	T mg/L	SD	C1 mg/L	SD	% D	C2 mg/L	SD	% D		T mg/L	SD	C1 mg/L	SD	% D	C2 mg/L	SD	% D	
Total 3-gluc	239,6	6,41	205,1	46,64	-14%	234,3	0,94	-2%		176,4	34,91	162,1	15,53	-6%	184,3	6,29	5%	
Total 3-acet gluc	16,4	2,83	12,4	2,18	-25%	13,4	1,31	-19%		42,0	12,51	37,6	4,43	-11%	35,4	6,88	-16%	
Total 3-cum gluc	26,0	1,47	21,5	6,13	-17%	24,6	0,84	-5%		38,9	20,36	29,0	4,22	-26%	31,2	0,97	-20%	

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C2 – valor médio da concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Para a cola E comprovou-se que o decréscimo é idêntico para todas as antocianinas onde se observou o decréscimo é mais acentuado na casta Trincadeira, no ensaio com concentração mais elevada.

Quadro 4 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola à base da proteína de ervilha (E) ao fim de 7 dias de colagem

Cola E+L	Trincadeira									Touriga Nacional								
	T mg/L	SD	C1 mg/L	SD	% D	C2 mg/L	SD	% D		T mg/L	SD	C1 mg/L	SD	% D	C2 mg/L	SD	% D	
Total 3-gluc	265,7	5,39	257,6	0,74	-3%	234,8	15,45	-12%		174,9	8,75	150,7	39,13	-14%	156,7	0,32	-10%	
Total 3-acet gluc	19,4	0,13	17,6	0,80	-10%	16,8	0,60	-13%		42,1	0,38	34,7	7,60	-18%	36,7	2,64	-13%	
Total 3-cum gluc	30,9	2,56	26,4	1,10	-15%	25,1	3,19	-19%		29,5	0,11	22,9	4,98	-22%	26,9	0,14	-9%	

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C2 – valor médio da concentração mais elevada; cola E – cola feita à base de proteína de ervilha. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Na cola E+L, para a casta Trincadeira, existiu um decréscimo mais acentuado nas antocianinas cumariladas. Na casta Touriga Nacional observou-se uma diminuição em todas as antocianinas.

Quadro 5 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola à base de proteína de ervilha e extracto de levedura. (E + L) ao fim de 7 dias de colagem

Cola E+L	Trincadeira									Touriga Nacional								
	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D		
	mg/L		mg/L			mg/L			mg/L		mg/L			mg/L				
Total 3-gluc	285,7	5,39	257,6	0,74	-3%	234,8	15,45	-12%	174,9	8,75	150,7	39,13	-14%	156,7	0,32	-10%		
Total 3-acet gluc	19,4	0,13	17,6	0,80	-10%	16,8	0,60	-13%	42,1	0,38	34,7	7,60	-18%	36,7	2,64	-13%		
Total 3-cum gluc	30,9	2,56	26,4	1,10	-15%	25,1	3,19	-19%	29,5	0,11	22,9	4,98	-22%	26,9	0,14	-9%		

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C2 – valor médio da concentração mais elevada; cola E+L – cola feita à base proteína de ervilha e extracto de levedura. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Na cola Alb, nos dois vinhos estudados, observou-se uma diminuição mais evidente nas antocianinas acetiladas. No caso da bentonite (sendo uma cola de origem mineral) constatou-se um decréscimo mais acentuado, principalmente, na C2 para todas as antocianinas, resultado idêntico nas duas castas.

Quadro 6 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola à base de albumina de ovo atomizada. (Alb) ao fim de 7 dias de colagem

Cola Alb	Trincadeira									Touriga Nacional								
	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D		
	mg/L		mg/L			mg/L			mg/L		mg/L			mg/L				
Total 3-gluc	241,1	1,75	235,9	2,75	-2%	209,5	23,72	-	157,7	7,82	143,4	2,84	-9%	138,9	0,97	-		
Total 3-acet gluc	17,7	0,56	16,0	1,06	-	14,6	0,89	-	41,9	0,94	25,5	0,14	-	31,1	0,10	-		
Total 3-cum gluc	26,3	0,03	25,4	0,60	-3%	21,2	3,30	-	21,1	0,19	20,0	0,25	-5%	18,9	0,46	-		
								13%					37%			12%		
					10%			18%								26%		
								19%								11%		

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C2 – valor médio da concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Quadro 7 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola para a cola feito à base de Bentonite ao fim de 7 dias de colagem

Cola Bent	Trincadeira									Touriga Nacional								
	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D	T	SD	C1	SD	% D	C2	SD	% D		
	mg/L		mg/L			mg/L			mg/L		mg/L			mg/L				
Total 3-gluc	239,3	13,88	226,7	13,36	-5%	210,8	8,83	-12%	119,8	4,59	114,9	3,96	-4%	113,1	0,27	-6%		
Total 3-acet gluc	16,7	1,00	14,5	0,31	-14%	13,9	0,14	-17%	29,3	0,46	27,2	0,19	-7%	25,4	0,12	-13%		
Total 3-cum gluc	27,4	2,27	25,2	3,58	-8%	21,5	1,80	-22%	16,5	1,00	16,1	0,59	-2%	15,3	1,15	-7%		

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C2 – valor médio da concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Comparando os resultados dos ensaios de colagem ao fim de sete dias e ao fim de dois meses (quadros 3 e 8) para a cola L observou-se que na casta Trincadeira existe um maior decréscimo nas antocianinas acetiladas no início de ensaio, a partir do qual existe uma tendência a estabilizar.

Quadro 8 - Valores médios das antocianinas nas castas Trincadeira (Tr) e Touriga Nacional (TN) para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 2 meses de ensaio.

Trincadeira	T mg/L	SD	C1 mg/L	SD	% D	C2 mg/L	SD	% D
Total 3-gluc	134,9	7,33	115,7	16,43	-14%	126,0	2,48	-7%
Total 3-acet gluc	10,1	0,16	9,5	1,29	-5%	9,7	0,51	-4%
Total 3-cum gluc	14,2	2,64	11,4	1,65	-20%	12,5	1,13	-12%
Touriga Nacional	T mg/L	SD	C1 mg/L	SDT	% D	C2 mg/L	SDT	% D
Total 3-gluc	108,3	13,55	105,6	7,94	-2%	105,6	4,10	-2%
Total 3-acet gluc	135,6	2,55	26,4	2,33	-81%	24,5	1,43	-82%
Total 3-cum gluc	16,5	0,78	14,9	0,97	-10%	15,3	0,13	-7%

Legenda: T – valor médio da testemunha; C1 – valor médio da concentração mais baixa; C 2 – valor médio da concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras. SD – Desvio padrão, % D – percentagem decréscimo

Contudo o decréscimo é mais acentuado nas antocianinas cumariladas no ensaio de dois meses do que o observado no ensaio dos 7 dias. Na Touriga Nacional existiu um maior diminuição percentual nas antocianinas cumariladas no ensaio ao fim sete dias (estabilizando até à leitura feita ao fim de 2 meses), sendo o decréscimo mais pronunciado nas antocianinas acetiladas no ensaio de dois meses.

CONCLUSÕES

A clarificação do vinho pelas colas usadas foi seguida pela medição da turbidez, após sete dias de colagem. A turbidez tem tendência a decrescer com a aplicação das colas. Do ponto de vista físico-químico, as colas estudadas afectaram com baixa percentagem de decréscimo, os parâmetros da cor analisados. A sua acção foi sobretudo notória para os taninos, tendo consequências a nível da adstringência dos vinhos. Comparando os parâmetros da cor entre os dois ensaios comprovou-se que, na casta Touriga Nacional, há um decréscimo mais acentuado no ensaio ao fim de dois meses. Na casta Trincadeira,

a percentagem de decréscimo não é tão evidente mas conclui-se que existe um decréscimo mais acentuado do que o verificado no ensaio ao fim de 7 dias. No caso dos Taninos, verificou-se um comportamento diferenciado para as duas castas. Na casta Trincadeira existe um maior decréscimo no caso do ensaio dos 2 meses, sendo o inverso para a casta Touriga Nacional, isto é a redução dos taninos é mais evidente no início do ensaio, estabilizando até ao final. Sendo a mesma cola, poderá ser explicado este facto por se estar perante duas castas com composição fenólica diferente. No que se refere às antocianinas monoméricas comprovou-se um decréscimo global de todos os picos identificados nos cromatogramas. Este decréscimo foi mais acentuado na cola E e concentração em todas as antocianinas e para a cola E+L na casta Touriga Nacional. Contudo para as colas L e Alb um maior decréscimo nas antocianinas acetiladas e cumariladas. No que se refere ao estudo das antocianinas presentes no vinho, verificou-se que estas colas actuam, sobretudo, sobre as antocianinas aciladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2007). Protein fining agents: Characterisation and red wine fining assays. *Italian Journal of Food Science* **19**: 39-56.
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2009). Effect of various Proteins on Different Molecular Weight Proanthocyanidin Fractions of Red Wine during Wine Fining. *American Journal of Enol. Vitic.* **60**: 74-81.
- Dallas, C., Laureano, O. (1994) - Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and coloured matter on the wines prepared with three Portuguese grape varieties. *Vitis*, **33**: 41-47.
- Iturmendi, N., Durán, D., Marín-Arroyo, M. R. (2010). Fining of red wines with gluten or yeast extract protein. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**: 200-207.
- Lefebvre, S., Gerland, C., Maury, C. & Gazolla, M. (2000). Nouvelles colles végétales: origines, propriétés et performances. *Rev. Franc. Oenol.*, **184**: 28-32.
- Lefebvre, S., Gerland, C., Scotti, B. & Bonni, G. (2002). Le collage aux protéines végétales: performance à l'échelle de la cave . *Rev. Franc. Oenol.*, **195**: 31-34.
- Mira, H.M. (2004). Influência da aplicação de resinas permutadoras de íões, PVI-PVP e proteínas vegetais nas características dos vinhos. *Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia*: 215-273.
- Mira, H.M., Leite, P., Ricardo-da-Silva, J.M., Curvelo-Garcia, A.S. (2006). Plant Proteins in Wine Fining: Influence on Chemical and Sensory Characteristics. *Le Bulletin de L'OIV*, **79**: 277-296.
- OIV (1990). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Caractéristiques chromatiques. Paris, OIV.
- OIV (1999). Resolução 7/99: Collage. Office International de la Vigne e du Vin.
- OIV (2004). Resolução OENO 28/2004: Codex - Matières protéiques d'origine végétale. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- Sarneckis, C. J.; Dambergs, R. G.; Jones, P.; Mercurio, M.; Herderich, M. J.; Smith, P. A. (2006) Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **12**:39-49.
- Somers, T.C., Evans, M.E. (1977). "Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂ "chemical age". *J.Sci.FoodAgric.* **28**:279-287.

POTENCIAL ENVELHECIMENTO DE VINHOS POR TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Mickael C. SANTOS⁽¹⁾, Cláudia NUNES⁽¹⁾, Ana RODRIGUES⁽²⁾, Sílvia M. ROCHA⁽¹⁾, Jorge A. SARAIVA⁽¹⁾, Manuel A. COIMBRA⁽¹⁾

RESUMO

A tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) consiste em submeter os alimentos a elevadas pressões com o objetivo de destruir microrganismos e inativar enzimas para a sua preservação durante longos períodos de tempo. Neste trabalho, o processamento por APH foi aplicado no tratamento de vinhos como alternativa à adição de dióxido de enxofre (SO₂) visto que alguns consumidores são intolerantes e/ou alérgicos aos sulfitos. Os tratamentos de APH potenciaram a velocidade das reações de polimerização das antocianinas (decréscimo do teor de antocianinas livres) e promoveram as reações de Maillard (aumento do teor de furanos, acetais e de benzaldeído), dando origem a vinhos com características sensoriais similares aos vinhos envelhecidos/licorosos (cor alaranjada e aroma com notas de fruta tratada termicamente). Esta é uma tecnologia que pode originar vinhos com características diferentes do vinho produzido tradicionalmente, o que pode ser uma vantagem se a tradição for conciliada com a inovação.

Palavras-chaves: Vinho, alta pressão hidrostática, envelhecimento, cor, antocianinas, composição volátil, reações de Maillard, análise sensorial.

1 - INTRODUÇÃO

Durante a última década, a utilização de alta pressão hidrostática (APH) para a conservação de alimentos e também para a criação de novos tipos de produtos alimentares, tem aumentado substancialmente. Alimentos processados industrialmente por APH são

⁽¹⁾QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁽²⁾Dão Sul – Sociedade Vitivinícola, S.A., 3430-909 Carregal do Sal, Portugal

E-mail: Mickael@ua.pt

submetidos a pressões na ordem de 400-600 MPa durante alguns minutos para destruir os microrganismos e inativar as enzimas, com reduzido impacto nas suas características sensoriais e nutricionais (RAMIREZ *et al.* 2009).

No setor enológico, a utilização de tratamentos de alta pressão foi testado para a conservação de sumo de uva, de mosto e de vinho, tendo sido observado que pressões entre 300 e 500 MPa (durante 5 a 20 minutos) inativam bactérias e leveduras em vinhos tintos e brancos sem alterar significativamente as suas características sensoriais (BUZRUL 2012). Estes resultados sugeriam que a APH podia ser um processo alternativo à utilização de dióxido de enxofre (SO₂) para preservação de vinho. No entanto, TAO *et al.* (2012) demonstraram que tratamentos severos de alta pressão (650 MPa, durante 1 e 2 horas) alteravam as características físico-químicas do vinho tinto, diminuindo a intensidade da cor e o conteúdo de compostos fenólicos do vinho devido ao aumento de reações de condensação dos compostos fenólicos. Em termos de propriedades sensoriais, ocorre uma redução na intensidade das notas frutadas após 2 h de pressurização, enquanto a adstringência, a perceção de álcool e o amargor diminuem. Estas alterações físico-químicas e sensoriais são semelhantes às que ocorrem naturalmente durante o envelhecimento do vinho. Por esta razão, a APH tem sido referida como uma tecnologia que pode afetar certas reações químicas no vinho e, portanto, com a potencialidade de acelerar o processo de envelhecimento, podendo reduzir o tempo de estágio.

O objetivo deste trabalho foi aumentar o conhecimento fundamental sobre o efeito da APH no vinho, contribuindo para a avaliação da viabilidade do uso desta tecnologia para a preservação do vinho a longo prazo, na ausência de SO₂. O efeito da APH nas propriedades químicas e sensoriais de um vinho tinto foi analisado ao longo de 12 meses de armazenamento.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Tratamento das amostras

Um vinho tinto, sem a adição de SO₂, foi produzido pela Dão Sul SA (Carregal do Sal, Portugal), com uvas Touriga Nacional. Após a fermentação alcoólica, o vinho foi transferido para frascos de polietileno de 250 mL e rolhados. O vinho foi pressurizado durante 5 min a 20 °C a 425 MPa e 500 MPa, utilizando uma prensa hidrostática (Avure Tech-

nologies, Modelo 215L-600, EUA). Dois lotes de um mesmo vinho também foram engarrafados em garrafas de polietileno, um com adição de 40 ppm de SO₂, a quantidade normalmente utilizada na indústria vinícola, e outro lote que não foi sujeito a nenhum tratamento, nem adição de SO₂ nem tratamento de alta pressão. Todas as amostras de vinho foram armazenadas a 80% de umidade relativa, na ausência de luz e a uma temperatura compreendida entre 10 °C e 15 °C.

2.2 - Análise físico-química dos vinhos

As análises de cor foram realizadas recorrendo ao método de CIELAB usando um espectrofotômetro equipado com uma esfera de integração, permitindo determinar os parâmetros, a^* , b^* e L^* . O parâmetro L^* refere-se à luminosidade, o parâmetro a^* à relação verde/vermelho e o parâmetro b^* à relação azul/amarelo (BERKE e FREITAS, 2007). A atividade antioxidante foi determinada por uma adaptação ao método de ABTS descrito por RE *et al.* (1999). A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu* utilizando uma curva de calibração com ácido gálico (0–250 mg/L) (CHIRA *et al.* 2012). A concentração de antocianinas foi determinada por um método colorimétrico com variação de pH de 1,0 a 3,5 e medição dos valores de absorvância a 520 nm (CHIRA *et al.* 2012). Na determinação da concentração de proantocianidinas polimerizadas foi utilizado um método colorimétrico por medição de absorvância a 550 nm após uma hidrólise ácida com HCl (37%) a 100°C (CHIRA *et al.* 2012).

2.3 - Análise do teor de antocianinas monoméricas das amostras de vinho

As antocianinas monoméricas presentes em amostras de vinho foram analisadas por HPLC utilizando o método descrito por GONÇALVES *et al.* (2012).

As antocianinas foram identificadas de acordo com o seu espectro de UV-Vis. Os picos cromatográficos de todas as antocianinas foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com o tempo de retenção do padrão correspondente. A quantificação das antocianinas monoméricas foi feita com base numa curva de calibração obtida com solução padrão de malvidina-3-glucósido.

2.4 - Análise da composição volátil das amostras de vinho

O vinho (3 mL) foi colocado em frascos de vidro de 9 mL e foram adicionados 0,6 g de cloreto de sódio. Cada vinho foi analisado em triplicado. Os frascos foram selados com uma tampa contendo um septo de PTFE/Silicone e colocados num banho a $40,0 \pm 0,1$ °C, com uma agitação de 400 rpm. A fibra de microextração em fase sólida (SPME) com um revestimento de polidimetilsiloxano/carboxen/divinilbenzeno (PDMS/CAR/DVB) com uma espessura de 50/30 µm foi exposta ao espaço de vapor da amostra durante 20 minutos.

A fibra de SPME contendo os compostos voláteis foi introduzida manualmente no injetor do cromatógrafo (GC × GC-ToFMS), a 250 °C para permitir a desorção térmica dos compostos. O cromatógrafo estava equipado com um *liner* de vidro de 0,75 mm de diâmetro interno e as injeções foram realizadas em modo *splitless* (30 s). O equipamento GC × GC – ToFMS consiste num cromatógrafo em fase gasosa com um modulador criogénico duplo jet (período de modulação 5 s) e um forno secundário. Este cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (60 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) na primeira dimensão, enquanto na segunda dimensão foi utilizada uma coluna DB-FFAP (1 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). O hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 2,5 mL/min. O programa de temperaturas do primeiro forno foi de 40 °C durante 1 minuto, seguido de um aumento de 10 °C por minuto até 230 °C e por fim 230 °C durante 2 minutos. O programa de temperaturas do segundo forno foi de 70 °C durante 1 minuto, seguido de um aumento de 10 °C por minuto até 250 °C e permaneceu a esta temperatura durante 3 minutos. O detetor de massa operou por impacto eletrónico (EI) a 70 eV, com um varrimento de 33-350 *m/z* e a uma velocidade de aquisição de espectros de 125 scans/s e o valor de voltagem do detetor foi de -1786 V. Foram analisadas três alíquotas independentes de cada uma das amostras de vinho. Os dados da área de cada pico do CG foram usados como uma abordagem indireta para estimar o teor relativo de cada componente volátil.

2.5 - Análise sensorial das amostras de vinho

Uma prova cega foi efetuada, após 8 meses em garrafa, por um painel de 7 provadores da empresa da Dão Sul SA. Cada amostra de vinho foi designada com um

código de três dígitos aleatórios. Para cada vinho foi realizado uma análise descritiva da cor, sabor e aroma.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se, pelos parâmetros CIELAB, que os vinhos tratados por APH ao longo do armazenamento apresentavam uma maior luminosidade (L^* superior) e uma tonalidade mais vermelha e amarela (a^* e b^* superior), quando comparados com o vinho tratado com SO_2 e com o vinho sem tratamento. Os resultados obtidos pela análise de cor indicam que o vinho tinto com a APH adquire uma cor mais acastanhada ao longo do armazenamento. Nos vinhos pressurizados observou-se também um decréscimo na atividade antioxidante (27% e 15% nas amostras pressurizadas a 425 MPa e 500 MPa, respectivamente) e no conteúdo em compostos fenólicos totais (10%) principalmente devido à diminuição das antocianinas livres (50%) (Tabela 1) em relação aos vinhos não pressurizados ao fim dos 12 meses de armazenamento.

Tabela 1 – Teor de antocianinas monoméricas presentes nas amostras de vinho sem tratamento, com SO_2 e tratados com APH, a 425 MPa e 500 MPa, ao fim de 12 meses de armazenamento.

Parâmetros ¹	Sem tratamento	SO_2	425 MPa	500 MPa
Compostos fenólicos totais (mg/garrafa) ²	3,02 ± 0,43 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	10,81 ± 0,93 ^c	38,90 ± 3,38 ^d
Antocianidinas ³ (mg/garrafa)	Teor de antocianinas monoméricas (mg/L)¹			
Antocianinas	Sem tratamento	SO_2	425 MPa	500 MPa
Delfinidina 3-glucósido	0,41 ± 0,10 ^{cd}	0,62 ± 0,07 ^d	0,32 ± 0,02 ^{cd}	0,39 ± 0,03 ^{cd}
Petunidina 3-glucósido	1,76 ± 0,25 ^e	2,39 ± 0,29 ^f	0,94 ± 0,09 ^e	1,12 ± 0,05 ^{cd}
Peonidina 3-glucósido	1,56 ± 0,17 ^{cd}	1,94 ± 0,20 ^{abd}	0,77 ± 0,42 ^e	1,07 ± 0,61 ^c
Malvidina 3-glucósido	57,06 ± 7,72 ^e	69,70 ± 3,66 ^f	23,63 ± 0,30 ^e	23,29 ± 0,88 ^e
Delfinidina 3-acetilglucósido	3,97 ± 1,13 ^a	5,91 ± 0,75 ^a	10,51 ± 0,34 ^b	11,11 ± 1,48 ^b
Cianidina 3-acetilglucósido	0,85 ± 0,68 ^b	1,51 ± 0,34 ^{ab}	2,24 ± 0,30 ^{bc}	2,33 ± 0,24 ^{bc}
Petunidina 3-acetilglucósido	0,77 ± 0,13 ^d	0,69 ± 0,26 ^{de}	0,15 ± 0,01 ^e	0,29 ± 0,02 ^{ce}
Peonidina 3-acetilglucósido	0,48 ± 0,10 ^e	2,90 ± 0,54 ^{ab}	2,04 ± 0,10 ^a	2,16 ± 0,32 ^a
Malvidina 3-acetilglucósido	11,95 ± 0,49 ^d	12,40 ± 0,83 ^d	4,45 ± 0,12 ^b	4,40 ± 0,02 ^b
Peonidina 3-cumaroilglucósido	0,35 ± 0,13 ^e	0,57 ± 0,09 ^d	0,13 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,02 ^b
Malvidina 3-cumaroilglucósido	3,45 ± 0,40 ^e	4,41 ± 0,51 ^a	1,20 ± 0,14 ^b	1,05 ± 0,17 ^b
Total	82,90 ± 6,26 ^e	103,04 ± 7,53 ^f	46,43 ± 1,86 ^e	47,32 ± 3,84 ^e

¹ Todos os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os vinhos pressurizados apresentaram uma maior quantidade de depósito formado em garrafa. O depósito do vinho pressurizado apresentou uma quantidade de compostos fenólicos totais superior (10 vezes superior para o vinho tratado com 500 MPa) em relação ao vinho com SO₂, sendo este aumento atribuído à presença de maior quantidade de proantocianidinas polimerizadas (Tabela 2).

Estes resultados demonstram que os tratamentos de pressão aceleraram a velocidade de polimerização dos compostos fenólicos do vinho, nomeadamente antocianinas e proantocianidinas, formando compostos fenólicos polimerizados que se tornam insolúveis no vinho com o armazenamento.

Tabela 2- Conteúdo em compostos fenólicos totais, antocianinas e proantocianidinas no depósito formado durante o armazenamento dos vinhos sem tratamento, com SO₂ e tratados por APH (425 MPa e 500 MPa).

Parâmetros ¹	Sem tratamento	SO ₂	425 MPa	500 MPa
Compostos fenólicos totais (mg/garrafa) ²	3,02 ± 0,43 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	10,81 ± 0,93 ^c	38,90 ± 3,38 ^d
Antocianidinas ³ (mg/garrafa)	Teor de antocianinas monoméricas (mg/L)¹			
Livres	0,16 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,01 ^c	0,25 ± 0,01 ^c
Poliméricas	0,84 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^b	0,83 ± 0,02 ^c	0,92 ± 0,01 ^c
Total	1,00 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	1,07 ± 0,01 ^c	1,18 ± 0,02 ^c
Proantocianidinas (mg/garrafa)	9,17 ± 0,84 ^a	0,61 ± 0,01 ^b	31,40 ± 1,47 ^c	95,21 ± 4,00 ^d

Em termos de composição volátil as amostras de vinho pressurizadas apresentaram teores superiores de furanos, acetais, cetonas e aldeídos, comparativamente às amostras de vinho não pressurizados (Figura 1).

¹ Todos os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (*p* < 0,05).

² Antocianinas expressas como mg de equivalentes de malvidina 3-glucósido.

³ Compostos fenólicos totais expressos como mg equivalentes de ácido Gálico.

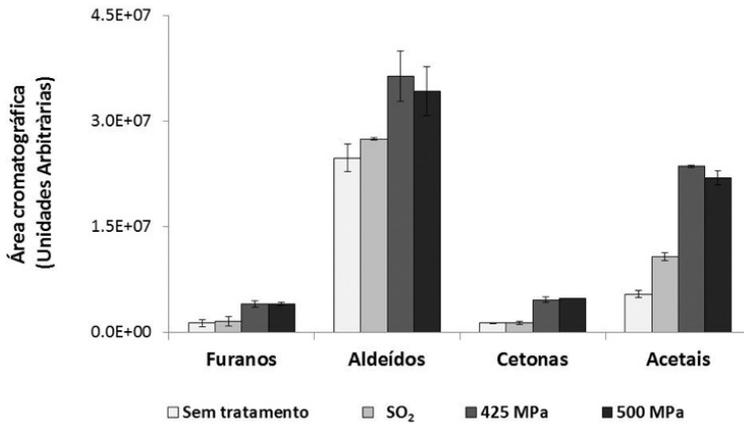


Figura 1- Perfil em furanos, aldeídos, cetonas e acetais nos vinhos sem tratamento, com SO₂ e tratados com APH, a 425 MPa e 500 MPa

O maior teor de furanos nos vinhos pressurizados é principalmente devido ao teor 3 vezes mais elevado de 2-furfural nestas amostras. O teor superior de aldeídos nas amostras de vinho pressurizado é principalmente devido ao maior teor de benzaldeído (1,5 vezes superior). Estes compostos são considerados compostos voláteis de Maillard, uma vez que o 2-furfural pode ser formado pela desidratação de açúcares através da reação de Maillard e o benzaldeído pode ser formado pela degradação de Strecker em resultado da reação de Maillard.

Em termos de cetonas e acetais as amostras pressurizadas de vinho apresentavam principalmente teores superiores de 2,3-pentanodiona e 1,1-dietoxi-etano, respetivamente, quando comparadas com as amostras de vinho não pressurizados. Os acetais e os furanos são também descritos como potenciais marcadores de envelhecimento, uma vez que o seu conteúdo aumenta durante o envelhecimento de vinhos licorosos (PERESTRELO *et al.* 2011).

Em termos de análise sensorial, os vinhos tintos pressurizados apresentaram uma boa apreciação global, nomeadamente em termos de cor, aroma e sabor. Contudo, os provadores referiram uma cor mais castanha, límpida e menos violeta e um aroma a compota e a especiarias nos vinhos que foram sujeitos ao tratamento de pressão. Estas diferenças

de aroma podem estar relacionadas com o teor superior de compostos voláteis de Maillard nos vinhos pressurizados, uma vez que estes compostos são descritos como tendo notas de fruta processada termicamente (PERESTRELO *et al.* 2011).

As alterações nas características do vinho tinto com os tratamentos de pressão, nomeadamente a cor mais acastanhada, o menor conteúdo em compostos fenólicos e o maior teor em furanos e aldeídos, podem dever-se à aceleração de reações que naturalmente ocorrem nos vinhos ao longo do armazenamento, como por exemplo as reações de polimerização dos compostos fenólicos e as reações de Maillard.

CONCLUSÕES

O tratamento de APH influencia a composição química dos vinhos, promovendo reações de Maillard e de polimerização dos compostos fenólicos, as quais têm impacto nas características sensoriais do vinho. Este é um aspeto que deve ser tomado em consideração na aplicação desta tecnologia para a preservação dos vinhos. Atendendo às alterações a nível da cor, promovendo o acastanhamento e, ao nível do aroma, promovendo notas mais adocicadas e a fruta processada termicamente, a aplicação de APH aos vinhos abre a possibilidade de produção de vinhos com características distintas aos vinhos de mesa, mas semelhantes aos vinhos envelhecidos/licorosos.

Esta tecnologia torna-se promissora na utilização de vinhos de castas muito adstringentes e/ou com potencial de envelhecimento baixo, visto que estes apresentam uma diminuição irreversível da qualidade após alguns meses de envelhecimento (TAO *et al.* 2012), podendo assim, beneficiar a indústria vinícola. Para estes vinhos, a APH pode ser potencialmente usada para acelerar o seu processo de envelhecimento, reduzindo o tempo de armazenamento, e/ou melhorar as suas propriedades sensoriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento dos projetos QREN-SI I&DT (3462) e PTDC/AGR-ALI/101251/2008 e da Unidade de Investigação 62/94-QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2011) pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, União Europeia,

QREN, FEDER e COMPETE. As bolsas de Cláudia Nunes (SFRH/BPD/46584/2008) e Mickael Santos (SFRH/BD/70066/2010) foram também financiadas pela FCT. Os autores agradecem à empresa Dão Sul S.A. (Carregal do Sal) e Frubaça (Alcobaça).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berke B, de Freitas V (2007). *J Sci Food Agric*. 87(2), 260-265.
- Buzrul S (2012). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 13, 1-12.
- Chira K, Jourdes M, Teissedre PL, (2012). *Eur Food Res Technol*. 234(2), 253-261.
- Gonçalves FJ, Rocha SM, Coimbra MA (2012). *Food Chem*, 134(2), 957-963.
- Perestrelo R, Barros AS, Camara JS, Rocha SM (2011). *J Agric Food Chem* 59(7), 3186-3204.
- Ramirez R, Saraiva J, Lamela CP, Torres JA (2009). *Food Eng. Rev*. 1, 16-30
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). *Free Radic Biol Med*. 26(9-10), 1231-1237
- Tao Y, Sun DW, Górecki A, Blaszczak W, Lamparski G, Amarowicz R, Fornal J, Jeliński T (2012). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. DOI: 10.1016/j.ifset.2012.09.005.

A ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA DE VINHOS

Madalena SIMOES¹; Sofia CATARINO²; Maria João CABRITA³

RESUMO

A estabilização tartárica de vinhos tintos é uma prática corrente em enologia. A eliminação de uma fração do ácido tartárico é conseguida pela sua precipitação pelo frio, com intervenção de catiões presentes nos vinhos, nomeadamente o potássio (K) e o cálcio (Ca). Atualmente existem resinas de troca iónica que ao removerem os catiões K e Ca impedem a precipitação do ácido tartárico. O presente estudo pretende contribuir para a compreensão do fenómeno de precipitação do ácido tartárico na forma de tartarato de cálcio e de bitartarato de potássio e das suas implicações na qualidade dos vinhos. Vários ensaios à escala industrial foram efetuados com diferentes vinhos e com um equipamento de troca iónica. Paralelamente cada um dos vinhos foi também sujeito a técnicas tradicionais de estabilização tartárica, por forma a obter vinhos estáveis do ponto de vista da estabilidade tartárica, embora com tecnologias diferentes. Foram efetuadas medições do teor em ácido tartárico por HPLC, dos catiões por espectrofotometria de absorção atómica com chama e avaliada a estabilidade tartárica pelo método do mini contacto.

Palavras Chave: estabilidade tartárica, troca iónica, frio, ácido metatartárico.

1- INTRODUÇÃO

A estabilidade tartárica dos vinhos antes do enchimento é uma questão que não raras vezes é motivo de preocupação dos enólogos. A precipitação do ácido tartárico por cristalização espontânea em condições naturais é um fenómeno imprevisível que pode ocorrer durante a vinificação, estágio, ou depois do enchimento, justificando-se assim os tratamentos de estabilização tartárica a que o vinho é sujeito. A pretensão de evitar a ocorrência da precipitação de cristais em vinhos embalados, prende-se com o facto de, esta ser encarada pelo consumidor como um fator depreciativo, mesmo que as caracte-

¹ Aluna do mestrado de Viticultura e Enologia da Universidade de Évora / CARMIM

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar, Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia. Quinta da Almoíña, 2565-191 Dois Portos, Portugal

³ CAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

¹ mjsimoes.couto@gmail.com; ² sofia.catarino@iniav.pt; ³ mjbc@uevora.pt

rísticas organoléticas do produto não sejam alteradas. Assim, garantir uma perfeita estabilidade físico-química dos vinhos, tornou-se para qualquer produtor um objetivo a atingir, com a finalidade de assegurar a qualidade exigida pelo consumidor.

O ácido tartárico e o ácido málico são os principais ácidos da uva e do vinho, sendo que a uva é o único fruto cultivado, de origem Europeia, onde se acumulam quantidades significativas de ácido tartárico. Especificamente, o isómero L(+)-tartárico pode atingir 20 gL⁻¹ no estado fenológico do pintor e entre 3,8 e 11,3 gL⁻¹ na maturação (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998).

O potássio é um dos raros minerais translocados pela seiva através do floema. O floema permite a translocação de açúcares provenientes da fotossíntese. Assim, durante a maturação, o aumento da concentração de potássio na uva está diretamente relacionado com a acumulação cinética de açúcar (SCHALLER *et al.*, 1992). A concentração de potássio no vinho é frequentemente elevada (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006), sendo o principal catião do vinho, com teores entre 0,5 e 2g L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). O teor de cálcio no vinho pode variar entre 30 a 200 mg L⁻¹ (FLANZY, 2003) e depende não só da quantidade existente nas uvas, mas também das operações tecnológicas e das condições de armazenamento. No entanto, pelo facto de ser bivalente é mais reativo que o potássio na precipitação e floculação de colóides (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). Existem duas técnicas de estabilização tartárica à disposição dos enólogos: estabilização química e estabilização física, sendo esta última a mais usada e mais antiga através do tratamento por frio cujo objetivo é, provocar de uma forma preventiva, uma cristalização para eliminar as substâncias em sobressaturação. A estabilização química pretende bloquear a sobressaturação do meio, com a ajuda de aditivos inibidores capazes de impedir as precipitações a longo prazo.

Mais recentemente, a aplicação de um processo de substituição promovido por resinas de troca de iões, com recurso a permutadores catiónicos, desde 2009 autorizada pelo Reg. (CE) N° 606/2009, abriu um novo campo de ação alternativo nos processos de estabilização tartárica.

O presente estudo contemplou a avaliação da estabilidade tartárica de vinhos tintos sujeitos aos tratamentos físico, químico e de substituição, pretendendo-se verificar o seu efeito sobre algumas características dos vinhos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vinhos

No ensaio foram utilizados 4 vinhos tintos da casta Aragonez provenientes da vinificação de uvas da campanha de 2012. Para a caracterização físico-química, os parâmetros massa volúmica, teor alcoólico adquirido, acidez volátil e ácido málico, foram determinados recorrendo ao equipamento de análise *winescan* (metodologia FTIR – *Fourier Transform Infrared*), a acidez total e açúcares redutores foram determinados pelo método oficial português (NP 2139/87 e NP 2223/88 respetivamente), o anidrido sulfuroso foi determinado pelo método de Paul (Regulamento CEE 2676/90).

2.2. Delineamento experimental

Após a fermentação maloláctica, os vinhos foram sujeitos aos seguintes tratamentos: estabilização tartárica pelo frio (VF), estabilização tartárica por adição de ácido metatartárico (VAM) e estabilização tartárica através de resinas de troca iónica (VR). Os ensaios foram efectuados em duplicado. A resina de troca iónica utilizada foi a pHStab da AEB Bioquímica

2.2. Determinação do ácido tartárico

O ácido tartárico foi determinado por HPLC num *Ultimate 3000* da *Dionex* com um detetor DAD. As amostras foram previamente diluídas em H_3PO_4 1N e filtradas. O método cromatográfico foi uma corrida isocrática com H_3PO_4 5×10^{-3} M, fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ numa coluna RP18 *Licrospher* da *Merck* e a deteção foi feita a 210nm. Foi estabelecida uma reta de calibração com 5 pontos, obtendo-se $R^2 = 0,9997$.

2.3. Determinação do cálcio e do potássio

O potássio (K) e o cálcio (Ca) foram determinados segundo o método OIV (2012) (OIV-MA-AS322-02) e OIV (OIV-MA-AS322-04), respectivamente, num espectrofotómetro de Absorção Atómica com chama (*Perkin Elmer, AAnalyst 100*), equipado com queimador de ar-acetileno e lâmpadas de cátodo oco de potássio e de cálcio (*Perkin Elmer*). O K é determinado directamente no vinho diluído após adição de CsCl para suprimir a ionização do K. O Ca é determinado directamente no vinho diluído, após adição de um tampão espectral (La_2O_3)

2.3. Teste minicontato

Determinou-se a estabilidade tartárica dos vinhos através do teste minicontacto de acordo com CAVALLUCCI (2006). Para tal foi utilizado o equipamento *Check Stab Alfa 2006 Thunder (Delta Acque)*, cujo princípio se baseia na medição da condutividade elétrica antes e após a aceleração máxima da precipitação dos cristais de tartarato, presentes numa amostra de 100 cm³ de vinho, à temperatura de 0°C.

2.4. Determinações espectrofotométricas

Os teores em polifenóis totais, flavonóides totais, flavonóides não antociânicos e antocianinas totais foram determinados segundo DI STEFANO *et al*, 1989. A intensidade e tonalidade da cor foram determinadas segundo GLORIES (1984) e SUDRAUAD (1958).

2.5. Tratamento estatístico

Para avaliar se as diferenças entre os resultados obtidos para os diferentes tratamentos, para cada vinho, eram significativas, efectuou-se uma análise de variância com teste de comparação de médias a $p < 0.05$ com o programa SPSS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados da análise sumária dos vinhos testemunha.

Tabela 1 – Resultados da análise sumária dos vinhos testemunha

Vinho	Massa volúmica (g cm ⁻³)	Teor alcoólico adquirido (%vol.)	Acidez volátil (g ác. acético L ⁻¹)	Acidez total (g H ₂ T L ⁻¹)	pH	Ácido málico (g L ⁻¹)	Açúcares redutores (g L ⁻¹)	SO ₂ Livre	SO ₂ Total
								(mgL ⁻¹)	
1T	0,9921	13,5	0,46	4,3	3,87	0,10	1,3	41	96
2T	0,9921	13,5	0,48	4,3	3,84	0,06	1,2	43	77
3T	0,9925	14,0	0,44	4,9	3,78	0,09	1,3	44	93
4T	0,9933	13,6	0,46	5,6	3,77	0,14	1,4	43	103

As figuras 1 e 2 mostram os resultados relativos aos parâmetros ácido tartárico, acidez total e pH nos vinhos em estudo.

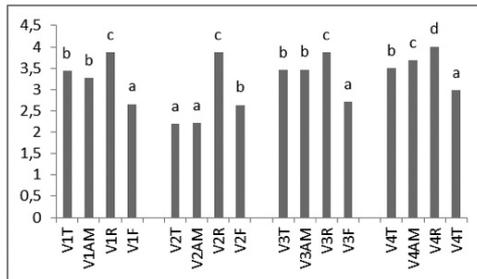


Figura 1 – teores de ácido tartárico (g L⁻¹)
 letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0.05), para cada vinho

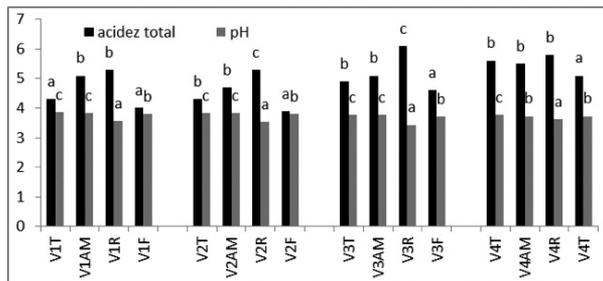
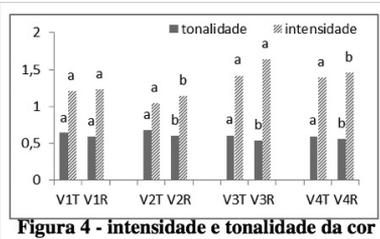
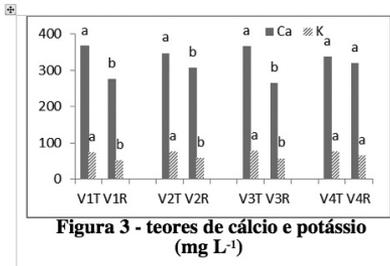


Figura 2 – acidez total (g H₂T L⁻¹) e pH
 letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0.05), para cada vinho

Da observação das figuras podemos verificar que, a adição do ácido metatartárico não alterou significativamente os teores de ácido tartárico dos vinhos. Com exceção do vinho 2, a aplicação de frio conduziu a uma diminuição dos teores de ácido tartárico, mas ao submeter os vinhos a um tratamento através das resinas de troca iónica verificou-se que os teores em ácido tartárico são mais elevados comparativamente aos outros tratamentos. A acidez total diminui com a aplicação de frio, apresentando vinhos tratados com as resinas valores inferiores de pH.

Foram ainda determinados os teores dos principais catiões envolvidos, o cálcio e o potássio (figura 3), nas testemunhas e nos vinhos tratados através do uso da resina de troca iónica. Foram ainda determinados alguns parâmetros relacionados com os compostos fenólicos (figura 5) e com a cor (figura 4).



letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0.05$), para cada vinho

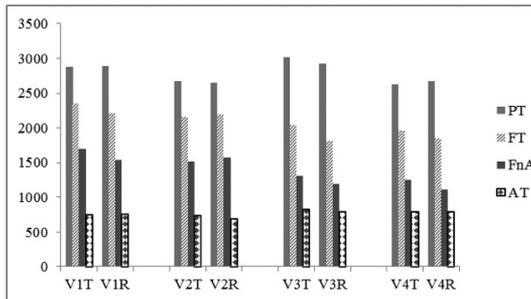


Figura 5 – teores de polifenóis totais, flavonóides totais, flavonóides não antociânicos e de antocianias totais (mg (+)catequina L⁻¹)

Da observação das figuras 3 e 4 podemos afirmar que tal como esperado, os teores de K e de Ca diminuíram em todos os vinhos após tratamento com as resinas. Contudo, existe um impacto na cor, visto observar-se uma diminuição da intensidade e aumento da tonalidade. Estas variações da intensidade e tonalidade da cor estarão possivelmente relacionadas com as alterações do pH dos vinhos submetidos ao tratamento com as resinas, pois apenas se verificaram ligeiras diminuições no teor em flavonóides totais e não antociânicos.

Na figura 6 apresentam-se os valores obtidos pelo teste de minicontacto para as variações de condutividade antes e depois da adição de KHT. Considerando que a partir de uma variação superior a 20 \square S, os vinhos se consideram instáveis (COUTO, 2008), conclui-se que a aplicação de ácido metatartárico, assim como o tratamento por resinas, conduziu a vinhos estabilizados. Já a aplicação do frio em caso algum deu origem a vinhos estáveis.

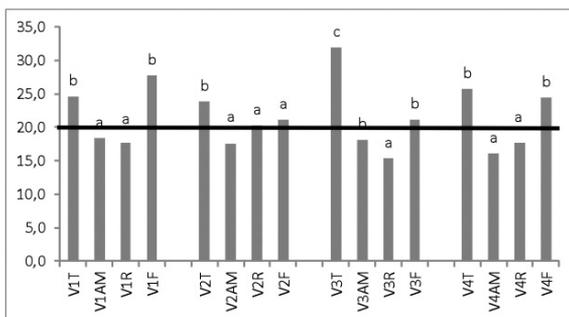


Figura 6 – variação da condutividade obtida no teste de minicontacto (μS)
 letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0.05$), para cada vinho

4. CONCLUSÕES

A aplicação de resinas de troca iónica para a estabilização tartárica de vinhos tintos, demonstrou ser uma tecnologia com interesse, conduzindo a vinhos estáveis, provocando uma diminuição do pH que é altamente benéfica para a estabilidade e conservação dos vinhos ao longo do tempo. Esta técnica não provocou alterações significativas na composição fenólica mas afectou a cor dos vinhos, deixando-os com uma cor mais intensa e viva. A aplicação de ácido metatartárico originou vinhos estáveis, porém é sabido que esta estabilidade pode ser comprometida ao longo do tempo de armazenamento dos vinhos. A aplicação de frio é uma técnica que apesar de conduzir a um abaixamento dos teores de ácido tartárico, nem sempre conduz a vinhos estáveis.

Agradecimentos: os autores gostariam de agradecer a AEB Bioquímica Portuguesa, S.A., nas pessoas de Ana Clemente e Ari de Mari.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OIV (2012). Compendium of international methods of wine and must analysis. Ed. 2012, vol. 2. International Organization of Vine and Wine, Paris.
- CAVALLUCCI, D. A. (2006). Check Stab Alfa 2006 Thunder- Use and Upkeep Guide. DeltaAcque. Florença.
- FLANZY, C. (2003). Enologia: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. 2ª Edição, AMV Ediciones; Ediciones Mundi Prensa. Madrid.
- RIBÉREAU – GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. (2006). Handbook of Enology – Volume 2 – The Chemistry of Wine – Stabilization and Treatments. 2ª Edição. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra.
- RIBÉREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A., DUBOURDIEU D (1998). Traité d’oenologie : Tome 2, Chimie du Vin, Stabilisation et Traitement. Dunod, Paris. 519p
- GLORIES, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 1ª partie: les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance Vigne Vin* 18 (3): 195-217
- SUDRAUD, P. (1958). Interpretation des courbes d’absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.* 7 (2): 203-208
- DI STEFANO, R.; CRAVERO, M.C.; GENTILINI, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L’enotecnico*, 5: 83-89
- COUTO, M. S., (2008). Determinação da estabilidade tartárica em vinhos tintos – Validação de um método instrumental. Instituto Politécnico de Beja. Escola Superior Agrária. Beja.
- NP 2233:1988 (Ed 1). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de açúcares redutores. Método de Luff – Schoorl. Instituto Português da Qualidade.
- NP 2139:1987 (Ed. 1) Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de acidez total. Instituto Português da Qualidade.
- Reg. (CE) N° 606/2009, da Comissão de 10 de Julho de 2009 que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n° 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (CEE) N.º 2676/90 – Métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho (1990). *Jornal Oficial da União Europeia*.

A MACROOXIGENAÇÃO CONTROLADA EM MOSTOS BRANCOS: UM CASO PRÁTICO

Cláudia LOPES¹; Raquel GARCIA²; Maria João CABRITA³

RESUMO

Durante o seu envelhecimento em garrafa, os vinhos brancos tendem a sofrer alterações nas suas características organolépticas e físico-químicas o que pode levar a uma perda de qualidade. Desta forma, com este trabalho pretende-se compreender a influência da macrooxigenação controlada em mostos brancos nas características físico-químicas dos vinhos ao longo do tempo.

Para o efeito foi efectuado um ensaio à escala industrial em que um mosto branco, inicialmente colocado num depósito de 20 000L, foi dividido em dois depósitos (8 000L). A um destes depósitos foi efectuada uma macrooxigenação controlada ao mosto, e ao outro não. No final das fermentações alcoólicas os vinhos foram filtrados e engarrafados.

As amostras em estudo foram sujeitas a um processo de envelhecimento acelerado, a uma temperatura constante de 55°C e por um período de 14 dias, de forma a avaliar as possíveis alterações na sua composição química e nas suas características cromáticas.

Palavras-Chave: macrooxigenação, envelhecimento acelerado, compostos fenólicos, HPLC

1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia, uma das maiores preocupações em torno dos vinhos brancos é a sua instabilidade durante o processo de envelhecimento em garrafa.

Com o passar do tempo, os vinhos brancos tendem a sofrer alterações nas suas características organolépticas e físico-químicas - composição volátil, composição fenólica, e

¹ Aluna do mestrado de Viticultura e Enologia da Universidade de Évora

² ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

¹; claudiagracaalopes@gmail.com; ² raquelg@uevora.pt; ³ mjbc@uevora.pt;

cor (acastanhamento) - o que pode levar a uma perda não só da qualidade como, também, do seu valor comercial (LOPEZ-TOLEDANO *et al.*, 2004). O acastanhamento dos vinhos resulta de uma séria de reacções oxidativas complexas por parte dos compostos fenólicos (KALLITHRAKA *et al.*, 2009).

A macrooxigenação é uma técnica pré-fermentativa, que se baseia na adição controlada de oxigénio ao mosto, até à sua saturação, provocando uma diminuição do teor em compostos fenólicos e conferindo uma estabilidade da cor ao vinho final, prolongando assim o seu tempo de vida em garrafa (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2011). A introdução da macrooxigenação dos mostos no processo de vinificação tem, assim, o objectivo de tentar evitar/prevenir que tais alterações aconteçam, eliminando eventuais problemas de oxidação e diminuindo o consumo excessivo de aditivos, tal como o SO₂.

A adição de oxigénio ao mosto, durante a prensagem, permite a eliminação dos compostos fenólicos facilmente oxidáveis, o que provoca uma diminuição do teor de compostos fenólicos, principalmente ao nível dos ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, mas confere uma maior estabilidade ao nível da cor. O acastanhamento pode ser, assim, evitado através da formação de GRP (grape reaction product), resultante da reacção entre as glutatínicas e *o*-quinonas formadas por meio de reacções de oxidação dos polifenóis presentes nas uvas (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2012; NEVARES & Del ALAMO, 2008; CHEYNIER *et al.*, 1991).

Desta forma, este trabalho tem como objectivo estudar o efeito da macrooxigenação num vinho branco à escala industrial, ao nível da cor e dos compostos fenólicos de baixo peso molecular, através da realização de um ensaio de envelhecimento acelerado, que pretende traduzir as condições reais de envelhecimento em garrafa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Os vinhos

As uvas das castas Síria e Rabo de Ovelha, da colheita 2012 da Adega Cooperativa de Reguengos de Monsaraz (Alentejo, Portugal), foram desengaçadas, esmagadas e colocadas numa cuba de 25000L para homogeneização, sendo posteriormente divididas em duas cubas de 8000L. O conteúdo de cada uma das cubas foi prensado duas vezes com uma prensa pneumática, sendo que a uma das cubas foi aplicada uma macrooxigenação

controlada do mosto (Ensaio – E), com doses de 4.9mL L^{-1} e 5.5mL L^{-1} de oxigénio em cada uma das prensagens, e a outra cuba que seguiu o procedimento normal, serviu como controlo (Testemunha – T). Os mostos tratados foram então transferidos para cubas de microvinificações (200L) para a realização normal da fermentação alcoólica (com adição de SO_2 , enzima pectolítica e leveduras) a 15°C , sendo esta monitorizada ao longo do tempo através da densidade e da temperatura. No final, e após uma clarificação estática, os vinhos foram filtrados e engarrafados.

Os vinhos sofreram, então, um processo de envelhecimento acelerado. Estes foram distribuídos por frascos de âmbar devidamente fechados e colocados numa estufa a $55.0\pm 2.0^\circ\text{C}$. Amostras foram retiradas passados 0, 2, 5, 7, 9, 12 e 14 dias de envelhecimento para análise.

Todos os parâmetros físico-químicos analisados, tanto dos mostos como dos vinhos, foram determinados recorrendo ao equipamento de análise grape scan e wine scan (metodologia FTIR – *Fourier Transform Infrared*), respectivamente.

2.2. Determinação dos compostos fenólicos de baixo peso molecular

Realizou-se uma extracção líquido-líquido a partir de 20mL de amostra e $3\times 10\text{mL}$ de éter dietílico. O extracto orgânico obtido foi evaporado até à secura num Rotavapor Buchi R-114 a 25°C , e o resíduo foi resuspenso em 1mL de metanol-água (1:1v/v) e filtrado para análise em HPLC.

A determinação dos diversos compostos fenólicos foi feita segundo o método de Rodríguez-Delgado et al (2001). Recorreu-se a um HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado com bomba quaternária, detector de fotodiodos, um injector automático programado para injectar $10\mu\text{L}$ e um sistema de obtenção e tratamento de dados com o software Chromeleon© versão 6.80. Utilizou-se uma coluna hidro-RP-80A synergi da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm x $4\mu\text{m}$). O solvente A foi metanol-ácido acético-água (10:2:88 (v/v)) e o solvente B foi metanol-ácido acético-água (90:2:8 (v/v)). Realizou-se uma corrida em gradiente: 100% até 85% de A em 15 minutos, até 50% de A em 10 minutos e até 30% de A em 9 minutos. O fluxo foi de $0,8\text{ mL/min}$ e a detecção foi feita a 280 e 320nm. Foram obtidos espectros de 190 a 600nm.

A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV-Vis dos compostos com padrões. As concentrações dos compostos (expressas em mgL^{-1}) foram determinadas a partir das rectas de calibração obtidas pela injeção de soluções padrão com diferentes concentrações.

2.3. Determinações espectrofotométricas

Para a determinação do acastanhamento nos vinhos, mediu-se a sua absorvância (A_{420}) num Espectrofotometro Beckman DU 530, contra um branco de água, numa célula de 1 cm de percurso óptico.

A determinação espectrofotométrica do teor em polifenóis totais foi feita a partir do método de Folin-Ciocalteu, adaptado para análise em vinhos brancos. Fez-se uma diluição das amostras de 1:2 em ácido sulfúrico 1N. Um volume de 1mL de cada amostra diluída, seguido de 2mL de ácido sulfúrico de 1N, é passado por um Sep-Pak C18 (Waters Sep-Pak® Classic C18, Waters Corp.), previamente activado com 2mL de metanol e 5mL de ácido sulfúrico 0.1N. Eluiu-se com 2mL de metanol e 5mL de água destilada para balão de 20mL. Adicionou-se 1mL da solução de Folin-Ciocalteu e 4mL de solução de carbonato de sódio a 10%, perfazendo-se o volume com água destilada. A leitura das soluções é feita após 90 minutos, num Espectrofotometro Beckman DU 530 a 750nm, numa célula de 1 cm de percurso óptico, contra um branco preparado de igual forma mas com água. O teor em polifenóis totais é expresso em mg de catequina/ dm^3 .
$$PT (\text{mg catequina}/\text{dm}^3) = 186.5 \times (A_{760}) \times \text{factor de diluição}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise sumária dos mostos e vinhos, tanto para o Ensaio (E) como para a Testemunha (T), é apresentada nas tabelas 1 e 2, onde se pode verificar que há uma ligeira diferença entre eles. Logo após a macrooxigenação é possível ver que existe um menor Índice de Polifenóis, bem como de intensidade corante, nos mostos tratados, tal como seria de esperar.

Tabela 1 – Análise sumária dos mostos

Amostra	Acidez volátil (g ác. AcéticoL ⁻¹)	Índice de Polifenóis	Abs 280	Abs 520	Intensidade da Cor	Antocianinas (mg/L)
T	0.03	11.6	17.2	0.9	3.5	75
E	0.07	10.2	15.3	0.1	2.3	54

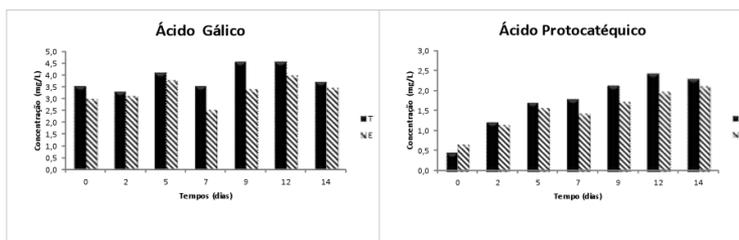
Tabela 2 – Análise sumária dos vinhos brancos

Amostra	Massa volúmica (g cm ⁻³)	Teor alcoólico adquirido (%vol.)	Acidez volátil (g ác. AcéticoL ⁻¹)	Acidez total (g H ₂ T L ⁻¹)	pH	Ácido málico (g L ⁻¹)	Açúcares redutores (g L ⁻¹)	SO2 Livre (mg L ⁻¹)	SO2 Total (mg L ⁻¹)
T	0.9901	13.12	0.32	6.54	3.38	1.32	0.75	12	69
E	0.9905	13.03	0.31	6.64	3.40	1.33	1.05	25	93

Na Tabela 3 apresenta-se a lista de padrões e parâmetros de detecção de cada um, e na Figura 1 encontram-se esquematizadas as variações encontradas para os teores nos diferentes compostos fenólicos de baixo peso molecular

Tabela 3 – Lista dos Padrões

Composto	Deteção (λ)	Equação da Recta	R ²
Acido Gálico	280	y = 0,6045x + 0,1238	0,9997
Acido Protocatéuico	280	y = 3,0633x + 0,088	0,9999
Aldeido Protocatéuico	280	y = 1,44x + 0,6466	0,9763
Acido Vanílico	280	y = 3,192x + 0,3823	0,9991
Acido Siringico	280	y = 0,7081x - 0,012	0,9999
Vanilina	280	y = 0,9334x + 0,0594	0,9999
Ácido p-cumárico	320	y = 0,6858x + 0,0094	0,9998
Acido Ferulico	320	y = 0,442x - 0,0348	0,9991



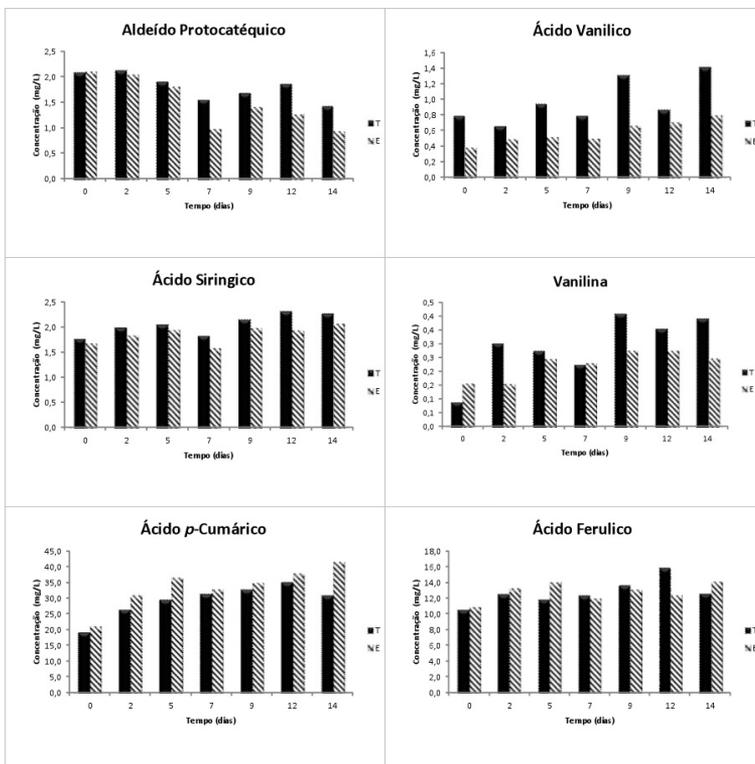


Figura 1 – Compostos fenólicos de baixo peso molecular

As variações demonstradas pelos gráficos (Fig.1) ao longo do tempo não nos permitem inferir uma tendência clara de aumento ou diminuição dos teores dos diferentes compostos fenólicos. Porém observa-se que os teores de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico apresentam valores superiores nos vinhos cujos mostos foram macrooxigenados. Todos os outros compostos apresentam valores superiores nos vinhos testemunha. Estes resultados estão de acordo com outros autores CEJUDO-BASTANTE *et al.* (2012), NEVARRES&DEL ALAMO (2008), CHEYNIER *et al.* (1991), KALLITHRAKA *et al.* (2009), entre outros. De facto, em ensaios de envelhecimento acelerado e de acordo com os mesmos autores, este aumento dos teores dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico deve-se à diminuição dos teores dos ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, provocado pela macrooxigenação aplicada aos mostos.

Tal como foi referido anteriormente, a macrooxigenação provoca uma diminuição dos compostos fenólicos facilmente oxidáveis, sendo os ésteres dos ácidos hidroxicinâmicos os mais afectados. Estas alterações ao nível dos teores dos compostos fenólicos vão ter um impacto directo na cor do vinho. É sabido que, uma maior ou menor concentração em compostos fenólicos presentes nos mostos e vinhos vai ter influência no processo de acastanhamento (EL HOSRY *et al.*, 2009). Tal pode ser comprovado na Fig.2, que nos mostra a evolução do acastanhamento para ambos os vinhos, no decorrer do teste de envelhecimento acelerado. Verificou-se que ocorreu uma alteração da cor para ambos os vinhos, contudo o acastanhamento mostrou-se mais acentuado no vinho Testemunha.

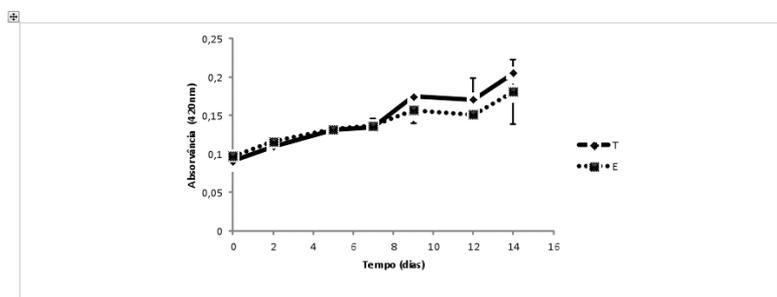


Figura 2 – Evolução do Acastanhamento (A_{420}) ao longo do tempo (em dias), para ambos os vinhos (T e E)

Apesar de a macrooxigenação induzir um acastanhamento ao mosto, facto esse que justifica os valores de absorvância iniciais do vinho E serem ligeiramente superiores aos do vinho T, o facto de provocar uma diminuição na composição fenólica do mosto e nos vinhos resultantes, faz com que as alterações cromáticas que vão ocorrer com o passar do tempo não sejam tão marcantes.

Quanto aos polifenóis totais (Fig 3), o seu teor mantém-se praticamente constante ao longo do tempo, resultado que está de acordo com KALLITHRAKA *et al.* (2009).

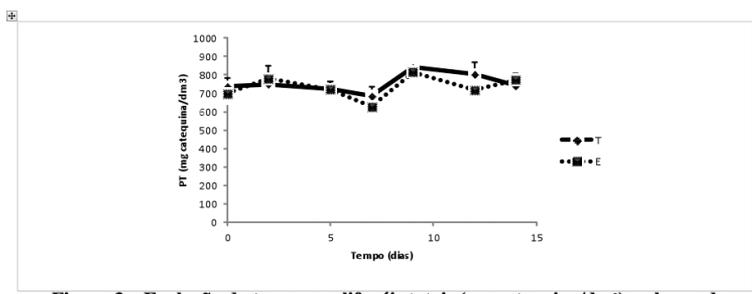


Figura 3 – Evolução do teor em polifenóis totais (mg catequina/dm³) ao longo do tempo (em dias), para ambos os vinhos (T e E)

Apesar de ligeiras variações, o teor em polifenóis totais mantém sempre dentro do mesmo intervalo de valores, para ambos os vinhos, o que não nos permite inferir sobre possíveis diferenças entre eles.

4. CONCLUSÕES

As condições de armazenamento de um vinho e o seu envelhecimento em garrafa têm um grande efeito na sua composição fenólica e características organolépticas. A aplicação do teste de envelhecimento acelerado às amostras em estudo, com a adopção de uma temperatura constante ($55.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$) por um razoável período de tempo (14 dias), permitiu-nos inferir sobre o desenvolvimento dos vinhos brancos em garrafa.

A geral diminuição dos compostos fenólicos que se observou parece ter sido causada pela macrooxigenação aplicada ao mosto, e transmitido aos seus vinhos, o que está de acordo com estudos anteriormente realizados sobre este tema. Esta diminuição vai, assim, contribuir para uma estabilização da cor do vinho.

Desta forma, é-nos possível afirmar, que a aplicação controlada de oxigénio (macrooxigenação) ao mosto irá conferir uma maior estabilidade às características físico-químicas do vinho final, permitindo um melhor e prolongado envelhecimento em garrafa, não descuidando da qualidade.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CEJUDO-BASTANTE, M. J., PÉREZ-COELLO, M. S., PÉREZ-JUAN, P. M. & HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. (2012). Effects of hyper-oxygenation and storage of Macabeo and Airén white wines on their phenolic and volatile composition, *Eur Food Res Technol*, 234:87–99
- CEJUDO-BASTANTE, M. J., CASTRO-VÁZQUEZ, L., HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. & PÉREZ-COELLO, M. S. (2011). Combined Effects of Prefermentative Skin Maceration and Oxygen Addition of Must on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics of Airén White Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 12171–12182
- CHEYNIER, V., SOUQUET, J. –M., SAMSON, A. & MOUTOUNET, M. (1991). Hyperoxidation: influence of various oxygen supply levels on oxidation kinetics of phenolic compounds and wine quality. *Vitis* 30, 107-115
- EI HOSRY, L., AUEZOVA, L., SAKR, A. & HAJJ-MOUSSA, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2459–2463
- LOPEZ-TOLEDANO, A., MAYEN, M., MERIDA, J. & MEDINA, M. (2006). Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chemistry*, 97, 498-504
- KALLITHRAKA, S., SALACHA, M.I. & TZOUROU, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidante activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* 113, 500-505
- NEVARESA, I. & del ÁLAMO, M. (2008). Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation. *Analytica Chimica Acta*, 621, 68–78
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A., MALOVANA, S., PÉREZA, J.P., BORGESA, T. & GARCÍA MONTELONGO, F.J. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 912, 249-257

AVALIAÇÃO DOS TEORES EM TANINOS ELÁGICOS E DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES TIPOS DE APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO

António M. JORDÃO ¹; Fernando J. GONÇALVES ¹; Ana C. CORREIA ¹; Ari De MARI ²

RESUMO

As aparas de madeira de carvalho existentes no mercado nacional, evidenciam uma grande diversidade ao nível da origem botânica das madeiras utilizadas (apresentadas de forma isolada ou em misturas), do tipo de queima, das dimensões e ainda das formas com que são apresentadas no mercado (chips, cubos, granulados, blocos, etc). Assim, tendo em conta esta grande variedade de produtos alternativos de madeira de carvalho existentes no mercado, o presente trabalho teve por objetivo efetuar uma quantificação dos diferentes taninos elágicos e da actividade antioxidante de extratos obtidos a partir de 14 diferentes amostras de aparas de madeira de carvalho comerciais existentes no mercado nacional.

Dos resultados obtidos, verificou-se que os teores em taninos elágicos, assim como a actividade antioxidante, apresentaram uma elevada dispersão de valores, estando estes, fortemente relacionados com a espécie de madeira de carvalho utilizada na elaboração das diferentes aparas, com a dimensão destas e ainda com o nível de queima.

Palavras chave: Aparas de madeira, actividade antioxidante, madeira de carvalho, taninos elágicos.

1 - INTRODUÇÃO

Desde 2006, que a União Europeia através do Regulamento da Comissão nº1507/2006, clarifica a utilização de pedaços de madeira de carvalho para fins enológicos. Tal facto, leva a que atualmente a utilização de aparas de madeira de carvalho tenha uma utilização

¹ Instituto Politécnico de Viseu (CI&DETS) - Escola Superior Agrária, Quinta da Alagoa, Estrada de Nelas, 3500-606 Viseu. Email: antoniojordao@esav.ipv.pt

² AEB Bioquímica Portuguesa S.A., Zona Industrial de Coimbrões, Fragosela, 3500-618 Viseu. Email: demari.aeb@mail.telepac.pt

bastante generalizada na elaboração dos vinhos, com vista ao aumento nomeadamente da complexidade sensorial destes, em substituição do tradicional estágio em barricas de madeira de carvalho.

São vários os compostos existentes naturalmente na madeira de carvalho (celulose, hemicelulose, lenhina e outros componentes extratáveis, como sejam os taninos elágicos), assim como outros, que se formam durante a operação de queima, como é o caso de vários compostos voláteis (VIRIOT *et al.*, 1993; JORDÃO *et al.*, 2005; 2007) e que durante o contacto com o vinho vão ser extraídos.

Os taninos elágicos pertencem ao grupo dos taninos hidrolizáveis, estando presentes na madeira de carvalho, podendo representar até cerca de 10% do peso da madeira seca (SCALBERT *et al.*, 1988). Os seus teores dependem, nomeadamente, da origem geográfica da madeira, das práticas florestais, da idade da árvore e da espécie de carvalho (VIVAS, 2002). Outros fatores associados às operações realizadas na tanoaria, influenciam também os teores em taninos elágicos presentes nas madeiras, como seja a secagem e ainda a operação de queima (FERNÁNDEZ DE SIMÓN *et al.*, 1999; JORDÃO *et al.*, 2007).

Vários autores sugerem que os taninos elágicos desempenham um importante papel nos processos de oxidação dos vinhos, nomeadamente devido ao facto de absorverem o oxigénio presente, contribuindo para a proteção dos vários constituintes do vinho contra os fenómenos de carácter oxidativo que podem afetar negativamente a qualidade destes (VIVAS & GLORIES, 1996; MOUTOUNET *et al.*, 1989).

Atualmente no mercado existe uma grande variedade de tipos de aparas de madeira de carvalho, como por exemplo sob a forma de cubos, blocos, granulados, entre outros, existindo também um elevado número de terminologias associadas às várias empresas que comercializam estes produtos.

Assim, tendo em consideração a elevada diversidade deste tipo de produtos enológicos e a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre a sua composição, o presente trabalho teve por objetivo efetuar uma quantificação dos diferentes taninos elágicos, do ácido elágico e da actividade antioxidante de extratos obtidos a partir de várias amostras de aparas de madeira de carvalho comerciais existentes no mercado nacional.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

Foram estudadas 14 diferentes amostras comerciais de aparas de madeira de carvalho, fornecidas pela empresa AEB Bioquímica Portuguesa S.A., e cujas principais características se encontram resumidas no quadro 1.

Quadro 1 - Principais características das diferentes aparas de madeira comerciais estudadas.

Códigos das amostras	Designação comercial	Nível de queima	Espécie de madeira carvalho	Dimensão (mm)
FB	Full body	Médio + forte ^a	<i>Q. petraea</i> + <i>Q. alba</i>	8.0
SCH	Super chocolate	Médio + forte ^a	<i>Q. petraea</i> + <i>Q. alba</i>	8.0
DTM	Domin oak M	Médio	<i>Q. petraea</i>	2.5 x 5.0 x 0.5 ^b
DTF	Domin oak F	Forte	<i>Q. petraea</i>	2.5 x 5.0 x 0.5 ^b
A2M	Boisélevage A2M	Médio	<i>Q. alba</i>	2.0
A2F	Boisélevage A2F	Forte	<i>Q. alba</i>	2.0
A8M	Boisélevage A8M	Médio	<i>Q. alba</i>	8.0
A8F	Boisélevage A8F	Forte	<i>Q. alba</i>	8.0
F2L	Boisélevage F2L	Ligeiro	<i>Q. petraea</i>	2.0
F2M	Boisélevage F2M	Médio	<i>Q. petraea</i>	2.0
F2F	Boisélevage F2F	Forte	<i>Q. petraea</i>	2.0
F8L	Boisélevage F8L	Ligeiro	<i>Q. petraea</i>	8.0
F8M	Boisélevage F8M	Médio	<i>Q. petraea</i>	8.0
F8F	Boisélevage F8F	Forte	<i>Q. petraea</i>	8.0

^aMistura em 50% de cada nível de queima; ^b Dimensões (comprimento x largura x espessura) em cm.

Da análise do quadro 1, é possível verificar que as amostras analisadas apresentavam várias formas e dimensões, estando tal facto também ilustrado na figura 1.



Figura 1 - Aspeto visual de algumas das diferentes aparas comerciais de madeira de carvalho estudadas. (A) Domin oak F; (B) Boisélevage A8M; (C) Boisélevage F2M; (D) Boisélevage F2L

2.2 - Métodos

Para a obtenção dos extratos das diferentes aparas objeto de estudo foi seguida a metodologia descrita por VIRIOT *et al.* (1994), na qual os taninos elágicos são extraídos com o recurso a dois solventes (acetona/água) durante 160 minutos à temperatura ambiente.

A partir dos extratos produzidos, efetuou-se a avaliação dos 4 taninos elágicos mais representativos e do ácido elágico por HPLC, recorrendo-se à metodologia descrita por VIRIOT *et al.* (1994). A avaliação da actividade antioxidante, foi realizada através de duas metodologias: DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) e ABTS (RE *et al.*, 1999). A quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos foi também efetuada recorrendo-se ao método descrito por SINGLETON & ROSSI (1965). Todas as extrações e determinações foram efetuadas em duplicado.

2.3 - Tratamento estatístico dos resultados

Para analisar as diferenças estatísticas entre os resultados, efetuou-se uma análise de variância e comparação dos valores médios (ANOVA, uma variável), tendo as diferenças entre os valores médios sido feita com o teste Scheffler ($p < 0.05$). O programa usado para o tratamento estatístico foi o Statistica versão 6.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, apontam para a existência de valores mais elevados em compostos fenólicos totais (figura 2) nos extratos das amostras de aparas de madeira da espécie *Q. petraea*, relativamente aos extratos das amostras de aparas da espécie *Q. alba*. Estes resultados estão na mesma linha de resultados anteriormente obtidos por outros autores (DUSSOT *et al.*, 2002; ALOÑÓN *et al.*, 2011).

Foi ainda possível constatar a existência de uma elevada variação de valores, tendo os teores em compostos fenólicos totais variado entre 128.3 (amostra DTF) e 824.8 mg/L (amostra F2F). Por outro lado, verificou-se que no geral, ocorreu uma tendência para um incremento dos teores em compostos fenólicos totais em função do aumento do nível de queima das amostras. Esta tendência é atribuída à termodegradação da lenhina resultante da operação de queima (HALE *et al.*, 1999).

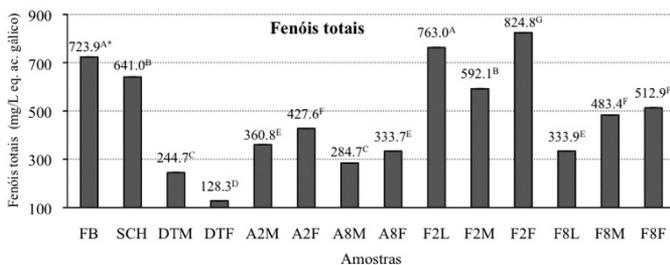


Figura 2 - Teores em fenóis totais quantificados nos extratos das aparas de madeira de carvalho.

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Nas figuras 3 e 4, são apresentados os resultados referentes aos taninos elágicos e aos teores em ácido elágico, quantificados nos extratos das diferentes aparas estudadas.

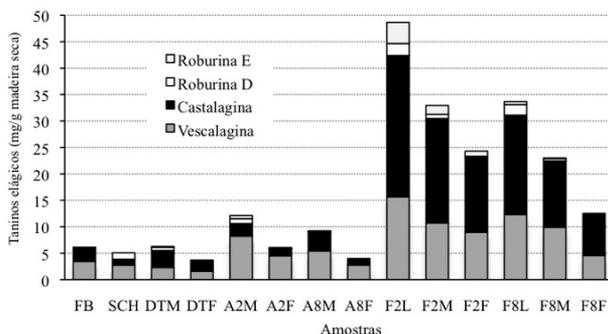


Figura 3 - Teores em taninos elágicos quantificados nos extratos das aparas de madeira de carvalho (valores expressos em equivalentes de ácido elágico).

Os resultados permitiram verificar que os extratos obtidos a partir das aparas de madeira da espécie *Q. petraea*, apresentaram valores em taninos elágicos e de ácido elágico superiores, relativamente aos extratos obtidos a partir de aparas da espécie *Q. alba* (figura 3). Por outro lado, foi ainda possível constatar que o incremento do nível de queima traduziu-se num decréscimo dos teores em taninos elágicos. Assim, os extratos obtidos a partir de aparas com um nível de queima indicado como forte (DTF, A8F, F2F e F8F)

apresentaram valores de taninos elágicos mais baixos relativamente aos extratos de aparas com as designações de queima ligeira e média. No caso dos teores em ácido elágico (figura 4), os resultados apontaram para um incremento dos seus teores com o nível de intensidade da queima das aparas. Este aumento, resulta da termodegradação que os taninos elágicos sofrem durante a queima, resultando daí a libertação de ácido elágico (VIRIOT *et al.*, 1993).

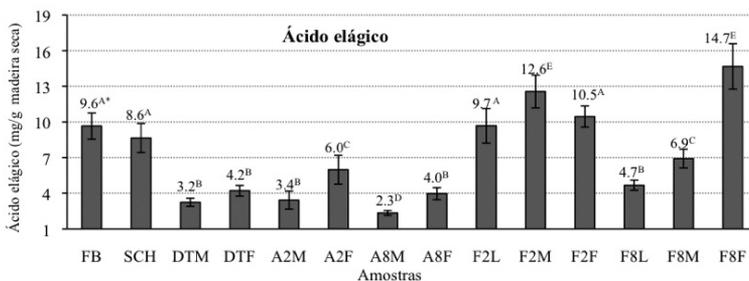


Figura 4 - Teores em ácido elágico quantificados nos extratos das aparas de madeira de carvalho.

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Os resultados obtidos permitiram ainda constatar que para iguais características das aparas de madeira estudadas (espécie de carvalho e nível de queima), os teores em taninos elágicos e de ácido elágico foram extraídos em maior quantidade a partir das aparas de menor dimensão (2.0 mm) relativamente às amostras de aparas de maiores dimensões (8.0 mm). Assim, a razão superfície/volume será um importante fator a considerar na maior ou menos extração destes compostos para os vinhos.

Considerando que muito dos compostos presentes nas aparas de madeira apresentam uma potencial actividade antioxidante, efetuou-se uma avaliação dessa actividade nos extratos das diversas aparas objeto de estudo (figura 5).

Assim, para as amostras objeto de estudo obteve-se um intervalo de valores muito acentuado, tendo a actividade antioxidante variado entre 16.9 e 201.1 e entre 8.8 e 184.0 $\mu\text{mol/g}$, respetivamente com a utilização do método DPPH e ABTS. Tal como aconteceu para os teores em fenóis totais, taninos elágicos e ácido elágico, foram no geral os extratos das aparas elaboradas a partir de *Q. petraea*, os que apresentaram valores mais ele-

vados de actividade antioxidante.

Os resultados obtidos permitiram ainda constatar que no geral, os extratos das aparas com intensidade de queima ligeira e média apresentaram valores de actividade antioxidante mais elevada relativamente aos extratos de aparas submetidas a níveis de queima consideradas como forte. Tal facto, permite indicar também que a queima induz a uma redução dos níveis de actividade antioxidante dos extratos obtidos.

Tal como se verificou para os fenóis totais e para os restantes compostos objeto de análise, foi também nos extratos obtidos a partir das aparas de menor dimensão que foi possível quantificar valores de actividade antioxidante mais elevada.

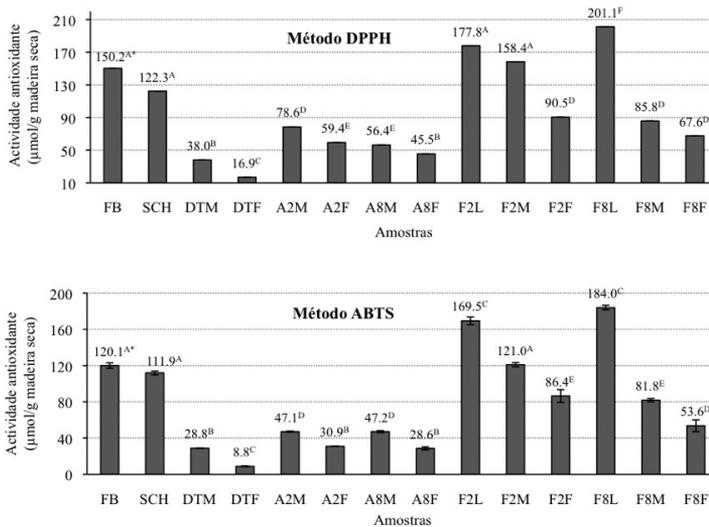


Figura 5 - Actividade antioxidante quantificada nos extratos das aparas de madeira de carvalho.

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$)

4 - CONCLUSÕES

Considerando os resultados alcançados, conclui-se que os teores em fenóis totais, taninos elágicos, ácido elágico e ainda a actividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos a partir das diferentes aparas de madeira de carvalho comerciais estudadas estão fortemente dependentes da origem botânica da madeira, dos níveis de queima e ainda das dimensões das aparas.

Assim, os extratos obtidos a partir das aparas de *Q. petraea* apresentaram valores mais elevados de fenóis totais, taninos elágicos, ácido elágico e actividade antioxidante comparativamente aos valores quantificados nos extratos obtidos a partir de aparas de *Q. alba*.

Os resultados apontaram ainda para que a utilização de aparas de madeira com níveis de queima mais elevados induzem à existência de valores mais elevados em fenóis totais, assim como de ácido elágico, ao contrário do que acontece para os valores em taninos elágicos. Por outro lado, embora ocorra com a queima um incremento dos valores em compostos fenólicos, a actividade antioxidante apresentou uma tendência para diminuir. Por último, verificou-se que as aparas de madeira de menores dimensões tendem a permitir uma maior extração dos compostos objeto de estudo e ainda uma actividade antioxidante mais elevada, comparativamente às mesmas aparas mas de maiores dimensões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANÓN M.E., CASTRO-VÁZQUEZ L., DÍAZ-MAROTO M.C., GORDON M.H., PÉREZ-COELLO M.S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chem.* 128:997-1002.
- 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.
- DOUSSOT F., DE JÉSO B., QUIDEAU S., PARDON P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single tree effects. *J. Agric. Food Chem.* 50:5955-5961.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., CADAHÍA E., CONDE E., GARCÍA-VALLEJO M.C. (1999). Evolution of phenolic compounds of Spanish oak Wood during natural seasoning first results. *J. Agric. Food Chem.* 47:1687-1694.

- HALE M.D., MCCAFFERTY K., LARMIE E., NEWTON J., SWAN J.S. (1999). The influence of oak seasoning and toasting parameters on the composition and quality of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:495-502.
- JORDÃO A.M., RICARDO-DA-SILVA J.M., LAUREANO O. (2005). Comparison of volatile composition of cooperage oak wood of different origins (*Quercus pyrenaica* vs. *Quercus alba* and *Quercus petraea*). *Mitt. Klosterneuburg* 55:31-40.
- JORDÃO A.M., RICARDO-DA-SILVA J.M., LAUREANO O. (2007). Ellagitannins from Portuguese oak wood (*Quercus pyrenaica* Willd.) used in cooperage: Influence of geographical origin, coarseness of the grain and toasting level. *Holzforschung* 61:155-160.
- MOUTOUNET M., RABIER P.H., PUECH J.-L., VERETTE E., BARILLERE J.-M. (1989). Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments* 9:35-51.
- 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. Medi.* 26:1231-1237.
- SCALBERT A., MONTIES B., FAVRE J.M. (1988). Polyphenols of *Quercus robur* adult tree and *in vitro* growth calli and shoots. *Phytochemistry* 27:3483-3488.
- SINGLETON V.L., ROSSI J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- VIRIOT C., SCALBERT A., LAPIERRE C.L., MOUTOUNET M. (1993). Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric Food Chem.* 41:1872-1879.
- VIRIOT C., SCALBERT A., HERVÉ DU PENHOAT C.L.M., MOUTOUNET M. (1994). Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry* 36:1253-1260.
- VIVAS N. (2002). *Manuel de Tonnellerie: À l'usage des utilisateurs de futaille*, Féret Ed., Bordeaux, França.
- VIVAS N., GLORIES Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:103-107.

CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE DIFERENTES MADEIRAS: INFLUÊNCIA DO GRAU DE TOSTA E DA ESPÉCIE BOTÂNICA.

Bruno SOARES¹, Sofia VALDANTAS², Raquel GARCIA³, Maria João CABRITA⁴

RESUMO:

Actualmente assiste-se a um interesse crescente pelo conhecimento das características de espécies botânicas alternativas ao carvalho, como por exemplo, a cerejeira, a acácia e o castanheiro e das implicações do seu uso nas características organolépticas dos vinhos.

O presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento das características cromáticas e da composição fenólica de diferentes espécies de madeiras com diferentes graus de tosta e do impacto da sua utilização em vinhos tintos.

Assim, em soluções hidroalcoólicas e em vinhos tintos com as diferentes madeiras em estudo serão avaliadas as características cromáticas e a composição fenólica. As madeiras em estudo serão o carvalho e o castanheiro portugueses, a acácia e a cerejeira, apresentando cada uma destas madeiras quatro diferentes níveis de tosta.

Palavras-chaves: aparas; cor; compostos fenólicos

1 - INTRODUÇÃO:

Nos últimos anos, diversos autores têm-se dedicado ao estudo de madeiras alternativas ao carvalho, e à influência da sua aplicação nos vinhos. Os principais trabalhos assentam no estudo da composição fenólica e da composição volátil e/ou aromática, quer das próprias madeiras, quer de soluções hidroalcoólicas (simulando vinho), ou ainda de vinhos fermentados e/ou maturados na presença de madeira.

^{1,3,4} ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

¹ bmosoares@hotmail.com; ² sofyavaldanta@hotmail.com; ³ raquelg@uevora.pt; ⁴ mjbc@uevora.pt

As espécies botânicas que têm sido alvo de interesse são várias para além do carvalho, mas principalmente castanheiro, acácia e cerejeira.

A composição química das madeiras utilizadas para fins enológicos depende da espécie botânica e da sua origem geográfica e ainda de uma série de processos a que estas se encontram sujeitas para serem utilizadas com essa finalidade. De entre os diferentes processos, destacam-se os tratamentos térmicos, nomeadamente a secagem e o processo de tosta, que vão imprimir alterações ao nível da composição química das madeiras.

Considerada como sendo o passo tecnológico mais importante em todo processo de preparação das madeiras, a tosta permite alterar a estrutura física da madeira devido ao aumento da temperatura, o que é crucial por forma a facilitar a formação das aduelas. Contudo, o facto mais relevante em todo este processo consiste na grande alteração da composição química devido à degradação térmica dos polímeros da madeira (Alañón *et al.*, 2009). A duração e a intensidade do tratamento térmico ao longo do processo de tosta das madeiras vão definir indubitavelmente as suas características. Embora seja uma etapa importante, não há consenso entre os diversos fabricantes sobre o binómio tempo/ temperatura e as designações de tostas ligeiras, médias ou fortes.

2 - MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 As madeiras: as quatro espécies de madeira estudadas neste ensaio foram fornecidas pela Tanoaria J.M. Gonçalves, Lda. As amostras de cerejeira (*Prunus cerasus*) e de acácia (origem botânica desconhecida) são provenientes da região centro da França, e as madeiras de castanheiro (*Castanea sativa*) e carvalho (*Quercus robur*) são de origem nacional, da zona de Carrazeda de Ansiães e da região das Beiras, respectivamente. Cada uma destas espécies foi submetida a um processo de secagem natural durante 25 meses (cerejeira e acácia), 22 meses (castanheiro) e 32 meses (carvalho). A tosta foi idêntica para as quatro madeiras e teve a duração de 2 horas, com as seguintes temperaturas: sem tosta = não sujeita a temperatura, tosta ligeira = 160°C, tosta média = 200°C, tosta forte = 240°C. Todas as amostras foram fornecidas na forma de aparas.

2.2 As extracções: foram preparadas soluções hidroalcoólicas com 12 % etanol e pH = 3.2 (ácido tartárico) que serviu como meio de extracção, simulando uma amostra de vinho, contendo 60 g de aparas /L. A extracção ocorreu durante 21 dias, no escuro e à

temperatura ambiente. No final, as amostras foram filtradas e guardadas a 2°C. Todas as extrações foram efectuadas em duplicado.

2.3 Os vinhos: a um vinho tinto (Touriga Nacional, Castelão e Trincadeira), da colheita de 2012, com teor alcoólico de 14° (%v/v), pH de 3,77 e acidez total de 5,72 (gL⁻¹) expresso em ácido tartárico, foram adicionadas 5 gL⁻¹ de cada uma das aparas em estudo. O ensaio foi realizado em duplicado e com uma testemunha à qual não se adicionaram aparas.

2.4 Métodos: o teor de polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas e dos vinhos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965). A determinação dos espectros de absorvância entre 250 e 450 nm, foi realizada num espectrofotómetro Lange DR 5000, utilizando uma célula de quartzo com percurso óptico de 1 cm. Os teores em antocianinas totais e livres foram determinados segundo Di Stefano *et al.*, (1989). As antocianinas totais foram calculadas a partir do máximo de absorvância no visível de uma solução de vinho com etanol clorídrico. As antocianinas livres, previamente separadas por um Sep-Pak C18, foram diluídas em etanol clorídrico, registando-se a sua absorvância máxima no visível.

Para a determinação da intensidade e tonalidade da cor dos vinhos realizou-se um varrimento no espectro visível (380 a 750nm) em cuvetes de 1 mm de percurso óptico num espectrofotómetro Lange DR 5000. A intensidade da cor vem definida pela soma das absorvâncias a 420, 520 e 620nm (Glories, 1984) e a tonalidade pelo quociente das absorvâncias a 420 e 520 nm (Sudraud, 1958).

Todas as análises referidas anteriormente foram realizadas em duplicado.

LC-DAD/ESI-MS: as amostras (10 µL) foram injectadas numa coluna Grace Smart RPC18, 150 mm × 2.1 mm ID, 3.0 µm, mantida a 30°C, instalada num LC Surveyor Thermo Finnigan com DAD e um espectrómetro de massa LCQ (ESI, ion trap). Foi usado um sistema binário: solvente A (água – ácido formico (99.9:0.1 (v/v))) e B (metanol), com o gradiente 5-45% B de 0-35 min; até 70% B de 35-40 min e 70% B durante 10 min, com fluxo de 0,2 mLmin⁻¹. No DAD a detecção foi feita entre 200-600 nm. As condições do espectrómetro de massa foram: temperatura do capilar de 300 °C, voltagem da fonte 5.0 kV, corrente da fonte de 100.0 µA, voltagem do capilar de -20.0 V no modo de ião negativo, detecção entre m/z 100-1200. A fonte de fragmentação era de 30V.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Soluções hidroalcoólicas

A figura 1 mostra os espectros de absorvância obtidos a partir dos extractos hidroalcoólicos das quatro madeiras analisadas, sujeitas aos diferentes níveis de tosta.

Nas madeiras de acácia, carvalho e castanheiro a tendência da linha de absorvância não varia em função do nível de tosta, mas tal não se verifica na madeira de cerejeira, observando-se um comportamento diferente da tosta forte em relação aos restantes níveis de tosta, apresentando um ligeiro aumento entre os 310 e os 390 nm.

A figura 1 mostra ainda um evidente máximo de absorção aos 280 nm nas madeiras de acácia e cerejeira, por sua vez, nas madeiras de carvalho e castanheiro é possível observar uma diminuição gradual da absorvância até aos 350 nm, mostrando a partir daí um comportamento praticamente constante, não variando com o aumento do comprimento de onda aplicado. Resultados similares foram obtidos por De Rosso et al., (2008).

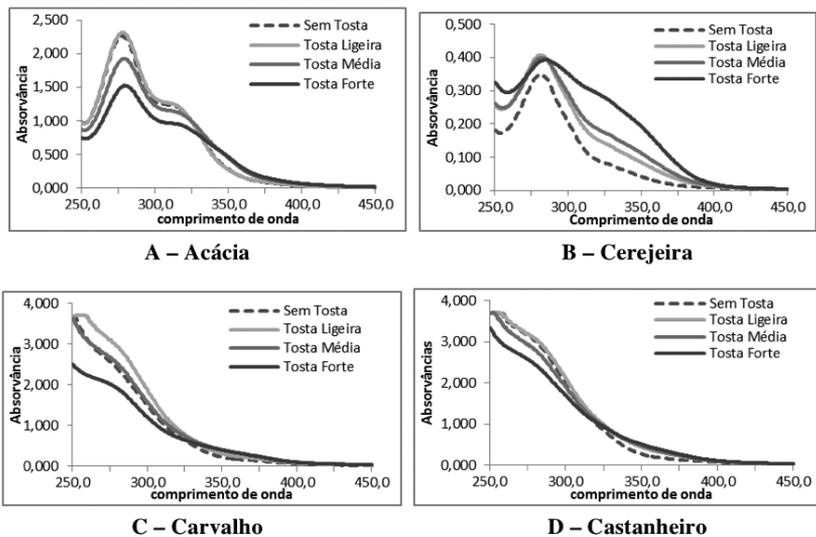


Figura 1. Espectros de absorvância (250-450nm) dos extractos hidroalcoólicos dos quatro tipos de madeira sujeitos aos diferentes níveis de tosta.

Na tabela 1 apresentam-se os valores para os polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas, onde se pode verificar que a madeira de cerejeira, seguida logo depois da de acácia, são as que menos compostos fenólicos cedem à solução hidroalcoólica.

Tabela 1 - Polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas (mg (+)catequinaL⁻¹)

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

Também se pode observar que à medida que o grau de tosta aumenta, os teores em compostos fenólicos cedidos têm tendência a diminuir, com excepção do extracto obtido com madeira de carvalho, no qual se observa um aumento de concentração da amostra não tostada para a tosta ligeira, seguindo-se um progressivo decréscimo, sendo a madeira com tosta forte aquela que apresenta os teores mais reduzidos. Nas figuras seguintes (Fig. 2 e 3) mostram-se os perfis cromatográficos dos diversos extractos hidroalcoólicos obtidos a partir das várias madeiras estudadas.

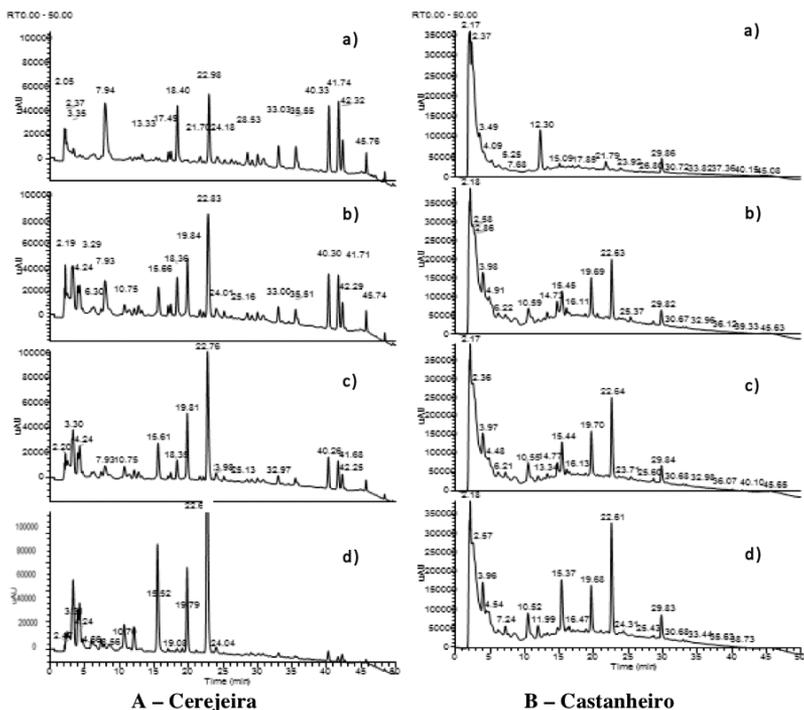


Figura 2 – Perfis cromatográficos de soluções hidroalcoólicas com aparas de cerejeira (A) e castanheiro (B): a) sem tosta, b) tosta ligeira, c) tosta media, d) tosta forte.

As figuras mostram que não só o perfil cromatográfico é diferente para as diferentes espécies botânicas, como é evidente a influência do aumento do grau de tosta no perfil cromatográfico. Para além dos compostos fenólicos que aparecem em todas as soluções em concentrações diferentes consoante o grau de tosta, nomeadamente ácidos fenólicos, derivados furânicos e aldeídos fenólicos (Soares et al, 2012), as diferentes madeiras caracterizam-se por possuírem outros compostos fenólicos característicos que podem ser utilizados para a sua diferenciação e cujos espectros de massa nos permitem afirmar que são maioritariamente flavonóides. Em particular, a acácia caracteriza-se pelo aparecimento de robinetina e dihidrorobinetina que não aparecem nas restantes espécies em estudo.

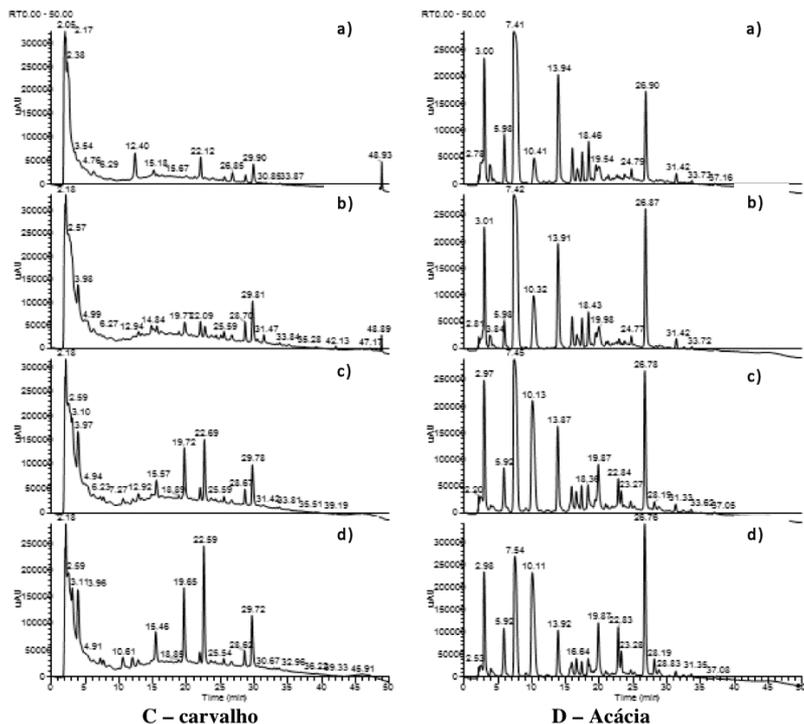


Figura 3 – Perfis cromatográficos das soluções hidroalcoólicas com aparas de carvalho (C) e acácia (D): a) sem tosta, b) tosta ligeira, c) tosta media, d) tosta forte.

Os valores apresentados na tabela 2, mostram que relativamente aos teores em polifenóis totais e antocianinas totais verificaram-se pequenas diferenças entre os diferentes níveis de tosta aplicados às madeiras, assim como em relação à testemunha. Por seu lado, o teor em antocianinas livres mostrou comportamento diferente entre espécies botânicas e níveis de tosta. De um modo geral, nos vinhos com adição de madeiras de acácia e carvalho observou-se um decréscimo do teor de antocianinas livres com o aumento do grau de tosta. O castanheiro também mostrou comportamento semelhante, excepto na tosta forte, na qual se verificou um aumento do teor em antocianinas livres. Em relação aos vinhos com adição de madeiras de cerejeira não é possível definir um comportamento relativamente a este parâmetro.

Tabela 2 – Polifenóis totais, antocianas totais e antocianas livres dos vinhos com as diferentes madeiras em estudo.

	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
Polifenóis totais (mgL⁻¹ (+)-catequina)					
Cast	2407,25±114,37 ^b	2293,95±40,92 ^{ab}	2214,69±97,07 ^a	2239,87±40,52 ^{ab}	2213,76±54,07 ^a
Aca	2207,69±2,35 ^b	2247,33±1,52 ^b	2218,88±3,19 ^b	2146,62±3,41 ^a	2213,76±54,07 ^b
Cer	2010,47±41,45 ^a	2087,40±43,35 ^{ab}	2115,38±9,18 ^b	2077,61±28,97 ^{ab}	2213,76±54,07 ^c
Car	2130±38,77 ^a	2109,78±42,70 ^a	2087,40±20,34 ^a	2078,54±4,93 ^a	2213,76±54,07 ^b
Antocianas Totais (mgL⁻¹ (+)-catequina)					
Cast	602,49±12,21 ^a	612,33±12,21 ^a	583,07±48,62 ^a	598,23±19,43 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
Aca	634,41±17,51 ^a	636,27±18,81 ^a	635,4715,16 ^a	625,47±13,94 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
Cer	626,16±14,50 ^a	634,14±13,09 ^a	635,74±1,37 ^a	627,23±9,26 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
Car	638,93±5,10 ^{ab}	634,94±10,11 ^{ab}	629,04±9,13 ^{ab}	649,04±17,66 ^b	622,44 ± 5,63 ^a
Antocianas Livres (mgL⁻¹ (+)-catequina)					
Cast	376,39±10,76 ^d	342,87±2,66 ^b	319,47±1,02 ^a	360,16±3,19 ^c	360,10 ± 8,21 ^c
Aca	375,86±6,46 ^c	366,81±5,31 ^{bc}	358,30±1,02 ^b	345,80±1,23 ^a	360,10 ± 8,21 ^b
Cer	341,54±3,13 ^b	360,96±2,01 ^c	316,54±1,37 ^a	391,02±1,84 ^d	360,10 ± 8,21 ^c
Car	356,44±5,07 ^c	341,54±5,07 ^b	331,44±1,37 ^{ab}	328,51±6,35 ^a	360,10 ± 8,21 ^c
Intensidade da cor					
Cast	9,260±0,058 ^a	9,515±0,214 ^a	9,790±0,543 ^a	10,215±0,745 ^a	9,515±0,664 ^a
Aca	8,660±0,958 ^a	9,110±0,046 ^a	9,585±0,121 ^a	9,685±0,271 ^a	9,515±0,664 ^a
Cer	8,950±0,046 ^a	8,880±0,115 ^a	9,200±0,012 ^a	9,240±0,000 ^a	9,515±0,664 ^a
Car	8,395±0,421 ^a	8,925±0,121 ^{ab}	9,080±0,069 ^{ab}	9,100±0,127 ^{ab}	9,515±0,664 ^b
Tonalidade da cor					
Cast	0,660±0,003 ^{ab}	0,672±0,005 ^b	0,654±0,011 ^{ab}	0,644±0,014 ^a	0,650±0,021 ^{ab}
Aca	0,678±0,003 ^b	0,685±0,000 ^{bc}	0,703±0,000 ^{dc}	0,719±0,000 ^d	0,650±0,021 ^a
Cer	0,645±0,002 ^a	0,669±0,002 ^b	0,663±0,002 ^{ab}	0,659±0,002 ^{ab}	0,650±0,021 ^{ab}
Car	0,675±0,011 ^b	0,666±0,003 ^{ab}	0,664±0,001 ^{ab}	0,661±0,003 ^{ab}	0,650±0,021 ^a

Legenda: Cast- castanheiro; Aca-acácia; Cer- cerejeira; Car- carvalho. Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a p<0,05

4-CONCLUSÕES:

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alañón M. E., Rubio H., Díaz-Maroto M. C., Pérez-Coello M. S. (2009). Monosaccharide anhydrides, new markers of toasted oak wood used for ageing wines and distillates. *Food Chemistry*, **119**, 505–512.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158.
- De Rosso M., Cancian D., Panighel A., Vedova A. D., Flamini R. (2008). Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatiles compounds and polyphenols. *Wood Sci. Technol.*, **43**, 375–385.
- Di Stefano, R.; Cravero, M.C.; Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'enotecnico* **5**: 83-89
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 1^a partie: les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance Vigne Vin* **18** (3): 195-217
- Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.* **7** (2): 203-208
- Soares B., Garcia R., Costa Freitas A.M., Cabrita M.J. (2012) Phenolic compounds released from oak, cherry, Chestnut and robinis chips into a synthetic wine: influence of toasting level. *Ciencia Téc. Vitic.* **27**(1) 17-26

A COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS COM INTERESSE ENOLÓGICO

Bruno SOARES¹, Nuno MARTINS², Raquel GARCIA³, Marco GOMES da SILVA⁴, Maria Joao CABRITA⁵

RESUMO:

O estudo da composição volátil de diferentes espécies botânicas com interesse enológico pode ser abordado com diferentes perspectivas desde o estudo das próprias madeiras ao estudo da composição volátil de soluções hidroalcoólicas contendo as madeiras em estudo e finalmente ao estudo de vinhos fermentados e/ou maturados em contacto com as madeiras.

A avaliação sensorial quer das soluções hidroalcoólicas quer dos vinhos é também uma ferramenta importante para a descrição/discriminação do impacto da utilização das madeiras de diferentes espécies botânicas

O presente trabalho tem dois objectivos: 1) contribuir para a caracterização da composição volátil de aparas de diferentes espécies botânicas; 2) perceber que compostos voláteis são extraídos das madeiras para uma solução hidroalcoólica, simulando vinho e qual o seu impacto sensorial

Palavras chave: Vinho, aparas de madeira, compostos voláteis, análise sensorial, cromatografia gasosa

1 - INTRODUÇÃO

Desde há muito que a composição das madeiras de carvalho de origem americana e francesa tem sido objecto de aprofundada investigação, levando ao reconhecimento das suas potencialidades para fins enológicos. O OIV (Office International de la Vigne et du Vin)

^{1,2,3,5}ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

⁴REQUIMTE, CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

¹ bmosoares@hotmail.com; ² martins.nuno86@sapo.pt; ³ raquelg@uevora.pt; ⁴ mdr@fct.unl.pt

⁵ mjbc@uevora.pt

apenas autoriza a utilização de barricas de carvalho e castanheiro em enologia, no entanto, a resolução Oeno 3/2005 vem permitir a sua utilização também na forma de alternativos (dominós, aparas e aduelas). Com a possibilidade de utilizar madeiras na forma de “alternativos”, equaciona-se a hipótese de utilizar madeiras de outras espécies botânicas no processo de maturação de vinhos, algumas delas até já outrora utilizadas, mas que acabaram por cair em desuso devido a problemas associados ao fabrico das vasilhas. Deste modo, não se pretende substituir o carvalho, amplamente utilizado no mundo vinícola actual e que apresenta um preço elevado, mas sim complementar e/ou melhorar as características dos vinhos obtidos, pela utilização de outras espécies botânicas.

No domínio da vitivinicultura, cedo se reconheceu a influência da madeira na qualidade dos vinhos e aguardentes (Singleton, 1974; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1976; Monties, 1987; Moutounet *et al.*, 1999).

Durante o período no qual os mostos/vinhos se encontram em contacto com as madeiras têm lugar uma série de transformações profundas que ocasionam importantes modificações na vivacidade e intensidade da cor, na estrutura e adstringência, assim como na sua composição aromática. Para além destas alterações ao nível das características sensoriais, este processo confere limpidez e estabilidade ao vinho (Margalit, 2004).

As madeiras usadas em enologia libertam para o vinho uma série de compostos químicos que vão intervir nas inúmeras reacções que têm lugar durante o envelhecimento, e desta forma vão contribuir para o bouquet dos vinhos. Neste contexto são de salientar os taninos, os compostos aromáticos, principalmente derivados fenólicos e os polissacáridos solúveis. A quantidade de substâncias libertadas para o vinho depende do tipo de madeira utilizado (Marco *et al.*, 1994), dos tratamentos de secagem e tosta aplicados à madeira (Sefton *et al.*, 1993; Chatonnet *et al.*, 1994; Cutzach *et al.*, 1997), e ainda, de uma série de outros factores, tais como o tempo de contacto da madeira com o vinho e as características dos vinhos (Puech, 1987; Spillman *et al.*, 1998).

Por estas razões, o uso de aparas, dominós ou aduelas como alternativa às tradicionais barricas, no processo de fermentação e/ou envelhecimento de vinhos, está a ser amplamente considerado, uma vez que permite conferir um aroma e sabor ao vinho de uma forma semelhante. Com a utilização desta técnica alternativa, é possível em simultâneo

acelerar o processo de maturação e reduzir os custos de produção dos vinhos obtidos. O facto de todo este processo poder realizar-se em qualquer tipo de cuba constitui também uma mais valia.

É neste sentido que surge o presente trabalho, no qual se pretende analisar a composição volátil de aparas de madeiras de carvalho, cerejeira, acácia e castanheiro, sujeitas a quatro tratamentos térmicos distintos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

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

2.2. Extração

2.2.1. Soluções hidroalcoólicas

Foi preparada uma solução hidroalcoólica com 12 % etanol e pH = 3.2 (ácido tartárico) que serviu como meio de extração, simulando uma amostra de vinho. Foram colocados 12 gramas de aparas em 200 mL dessa solução durante um período de 21 dias, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Para o efeito utilizaram-se frascos de 250 mL de volume, os quais foram agitados regularmente por forma a maximizar a extração de compostos a partir da madeira. Após esse período de tempo, as soluções foram filtradas, sendo armazenadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Todas as extracções foram efectuadas em duplicado (4 madeiras * 4 níveis de tosta * 2 repetições = 32 amostras).

2.2.2. Extracção com Líquido Pressurizado – PLE

A extracção sólido-líquido dos compostos voláteis das diversas amostras em estudo foi realizada por PLE (Extracção com Líquido Pressurizado) vulgarmente conhecido como ASE (Accelerated Solvent Extraction), marca registada da Dionex que comercializa o sistema denominado ASE 100. Este método de extracção tem sido proposto como um método de extracção exaustivo e bastante eficiente uma vez que permite extracções rápidas e completas (Giergielewicz-Mozajska *et al.*, 2001), e demonstra também ser um método preciso, que possibilita a redução do volume de solvente e dos tempos de extracção, sem degradação térmica dos compostos voláteis (Giergielewicz-Mozajska *et al.*, 2001).

De cada uma das amostras foram pesadas aproximadamente 3 g de madeira previamente triturada, seguida de homogeneização com 1.5 g de terras de diatomáceas, sendo a mistura resultante colocada numa célula de extracção (devidamente acondicionada com filtros de celulose em ambas as extremidades).

Após a preparação da célula, esta foi colocada no forno do equipamento iniciando-se o processo de extracção, atendendo às seguintes condições: temperatura de 150° C, pressão máxima de 1700 psi, utilizando diclorometano como solvente de extracção. Após alguns ensaios, com vista à optimização do processo de extracção, foi considerado que 3 ciclos estáticos de extracção com 7 minutos de duração cada seriam suficientes para extrair o maior número e quantidade de compostos, tendo sido estas as condições de extracção utilizadas para cada amostra.

Após a extracção no ASE, o extracto (aproximadamente 30 mL) foi seco com Na₂SO₄, adicionado com 1 mL de uma solução de 3-octanol em diclorometano de concentração 0,08mg/mL e, em seguida, a mistura resultante foi filtrada. Posteriormente, procedeu-se à sua concentração no rotavapor (BUCHI Rotavapor R-114) até se obter um volume de aproximadamente 2mL. Todas as extracções foram realizadas em duplicado.

2.3. Análise sensorial

As diversas soluções hidroalcoólicas obtidas foram analisadas por um painel de provadores (uns treinados outros não, num total de 44) com o objectivo de avaliar se as alterações induzidas pelos diversos tipos de madeira utilizados, são detectadas pelo painel

de provadores, apenas utilizando o sentido do olfato. Para tal, optou-se pela realização de provas triangulares, apresentando-se ao provador três amostras codificadas, sendo-lhe indicado que uma delas é diferente das outras duas, cabendo ao provador identificar a amostra que é diferente. Esta prova foi organizada e os resultados analisados de acordo com a norma ISO 6658 de 2005. Para cada conjunto de 3 amostras apenas varia a espécie botânica, para o mesmo grau de tosta.

2.4. Análise cromatográfica

Os extractos foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo gasoso (Thermo Finnigan-Trace GC) equipado com um detector selectivo de massas (Thermo Finnigan Polaris Q) e um injetor automático. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: o gás de arraste foi o hélio com fluxo constante de 1,0 mL/min; a coluna, uma ZB-Wax de 30 m × 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme (Zebron Capillary GC da Phenomenex) foi mantida inicialmente a 40° C por um período de minuto e depois foi aquecida a 4 °C/min até atingir 100 °C, seguida de novo aquecimento de 8 °C/min até aos 250 °C, onde se manteve 10 minutos; o volume de amostra injectado em modo splitless (por 1 minuto) foi 1,0 µL a uma temperatura de 250 °C. A detecção por espectrometria de massa foi feita por impacto electrónico (EI) no modo de "full scan", utilizando uma energia de ionização de 70 eV, e a temperatura da linha de transferência foi de 230°C.

Os extractos obtidos por ASE foram também analisados por cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC - FID), utilizando o cromatógrafo Agilent 7890A equipado com um modulador LMCS (-20°C) e um detector de ionização de chama FID.

Foram utilizadas as seguintes colunas: 1ª Dimensão - HP-5ms-UI, 30 m × 0,25 mm, com 0.25 µm de espessura de filme;

2ª Dimensão - SLB-IL61, 1,2 m × 0,10mm, com 0.08 µm de espessura de filme.

As condições cromatográficas utilizadas foram: gás vector foi o hidrogénio com um fluxo constante de 1,5 mL/min; o forno a 40°C durante três minutos, 10°C/min até aos 60 °C, 8 °C/min até aos 150°C e 10 °C/min até 280°C, mantendo-se esta temperatura durante 30 minutos; o volume de amostra injectado (em modo splitless com duração 1 minuto e meio) foi de 1,0 µL a uma temperatura de 280 °C. A temperatura do detector

foi de 280°C; o período de modulação teve a duração de 8 segundos e a taxa de aquisição de dados foi de 100 Hz.

3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. Análise sensorial

O ensaio desenvolvido no âmbito da análise sensorial das diversas soluções hidroalcoólicas foi conduzido de modo a avaliar se os provadores identificavam como sendo diferente o aroma das soluções hidroalcoólicas contendo as diferentes espécies botânicas em estudo, para o mesmo grau de tosta.

A análise das respostas dos provadores permite concluir que os extractos obtidos a partir de madeiras de diferentes espécies botânicas são significativamente diferentes. Deste modo, é possível afirmar-se que do ponto de vista olfactivo as quatro espécies botânicas estudadas são significativamente diferentes, considerando um nível de confiança de 95%, para todas as comparações.

Genericamente, pode entender-se que a quantidade e qualidade dos compostos cedidos ao meio é diferente de espécie para espécie, uma vez que as alterações verificadas no seu perfil sensorial são de tal forma marcantes que é possível a sua detecção por parte do painel de provadores.

3.2. Composição volátil das aparas

Os extractos das madeiras de carvalho e castanheiro mostraram perfis cromatográficos relativamente semelhantes, tendo sido identificados em ambas as madeiras compostos como: furfural, 5-hidroximetilfurfural, vinilguaiacol, triacetina, eugenol, vanilina, isoeugenol, siringaldeído, 4-hidroxi-2-metoxi-cinamaldeído, ácido palmítico, 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamaldeído e ácido linoleico. Embora não tenha sido possível identificar todos os compostos presentes nos cromatogramas das diversas espécies botânicas é possível concluir que o castanheiro é a madeira que apresenta maior diversidade de compostos voláteis. Também é importante referir que apenas na madeira de carvalho foi detectada a presença de esqualeno e tocoferol.

Embora seja caracterizada pela sua dureza e baixa porosidade a acácia mostrou ser uma madeira com elevado teor em compostos voláteis. Após analisar o seu perfil cromato-

gráfico é possível verificar que esta madeira é rica em compostos tais como o furfural, 5-metilfurfural, triacetina e eugenol.

A figura 1 ilustra, para algumas famílias de compostos, o efeito da tosta.

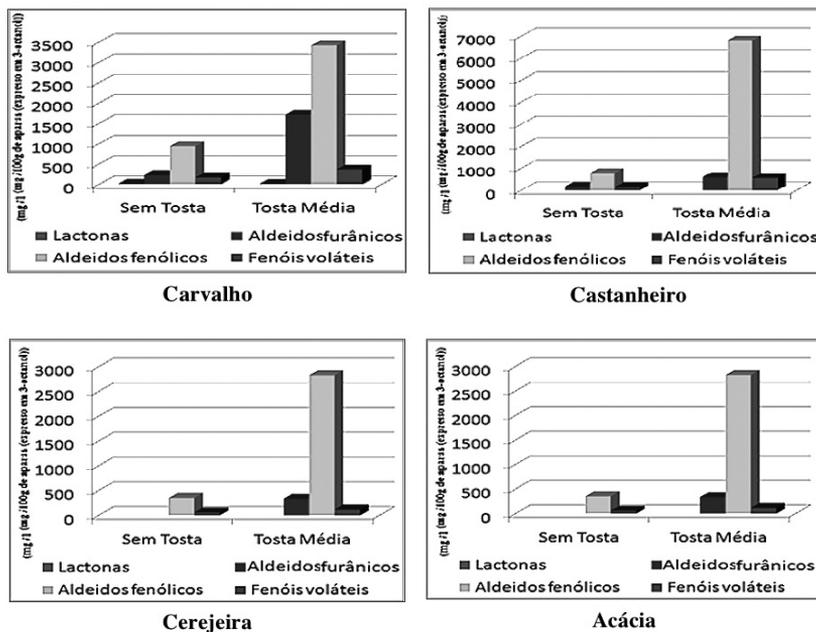


Figura 1 – teores totais de lactonas, aldeídos fenólicos, aldeídos furânicos e fenóis voláteis nas aparas das diferentes espécies botânicas, sem tosta e com tosta média.

Relativamente à intensidade do nível de tosta aplicado às madeiras foi notório que este factor influencia significativamente a composição química das madeiras, modificando consequentemente a natureza e quantidade das substâncias extraíveis. Devido a isso, a determinação do grau de tosta a aplicar é um aspecto de grande importância durante o processamento das madeiras, contudo a sua abordagem torna-se um pouco problemática até por não estar claramente definido o binómio tempo temperatura que define as terminologias de tosta ligeira, média ou forte.

Nas amostras analisadas verificou-se que o aumento do nível de tosta levou à formação

de compostos como a vanilina, o siringaldeído e o 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamaldeído, ao passo que o isoeugenol, o ácido linoleico e o ácido palmítico apresentaram comportamento contrário, ou seja, degradaram-se com o processo de tosta. Por sua vez, o 5-hidroximetilfurfural aumentou ao passar da amostra sem tosta para a tosta ligeira, tendo depois sofrido um processo de degradação com o aumento do nível de tosta.

É importante referir que este tipo de estudo não pode ser analisado isoladamente, muito embora permita conhecer quais os compostos presentes nos vários tipos de madeira, não é possível saber com exactidão quais os que irão passar efectivamente para o vinho durante o período em que estão em contacto. Para além disso existe ainda um outro factor que interessa ter em consideração, que é a cinética de extracção, uma vez que este parâmetro permite controlar a libertação de compostos pela madeira, tendo influência directa na determinação do tempo ideal de contacto entre o vinho e a madeira.

A cromatografia multidimensional permite obter ainda mais informação sobre a composição das diferentes espécies de madeiras. Assim, os extractos de carvalho, castanheiro e acácia parecem ter uma composição semelhante, enquanto os extractos da cerejeira se caracterizam por uma predominância de flavanonas e chalconas.

4. CONCLUSÕES

Após analisar os resultados obtidos neste ensaio, que contribuiu para o estudo de diferentes tipos de madeiras com possível interesse enológico, pode concluir-se que as várias espécies botânicas estudadas apresentam diferenças significativas ao nível da sua composição volátil, e como tal, o factor espécie botânica pode ser considerado com um parâmetro indutor de variabilidade.

O efeito da intensidade da tosta foi outro parâmetro analisado neste estudo, e verificase que a tosta provoca alterações significativas na composição volátil das madeiras, provocando a degradação de alguns constituintes e a formação de outros mais voláteis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHATONNET P., BOIDRON J. N., DUBOURDIEU D., PONS M. (1994). Evolution of oakwood volatile compounds during seasoning. First results, *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **28** 359–380.
- CUTZACH I., CHATONNET P., HENRY R., DUBOURDIEU D. (1997). Identification of volatile compounds with a “toasty” aroma in heated oak used in barrelmaking. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2217-2224.
- GIERGIELEWICZ-MOZAJSKA H., DABROWSKY L., NAMIENIK J. (2001). Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples: some aspects of theory and practice. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **31**, 149-165.
- MARCO J., ARTAJONA J., LARREMI M. S., RIUS F. X. (1994). Relationship between geographical origin and chemical composition of wood for oak barrels. *Am. J. Enol. Vit.*, **45**, 192-200.
- MARGALIT Y. (2004). Concepts in wine technology. The wine appreciation guild. USA. San Francisco.
- MONTIES B. (1987). Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin*, **22**, 169-190.
- MOUTOUNET M., PUECH J.L., KELLER R., FEUILLAT F. (1999). Les caractéristiques du bois de chêne en relation avec son utilisation en oenologie. Le phénomène de duramisation et ses conséquences. *R. F. Oenol.*, **174**, 12-17.
- PUECH J L. (1987). Extraction of phenolic compounds from oak wood in model solutions and evolution of aromatic aldehydes in wine aged in oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 236-238.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P. (1976). Traité d'oenologie. Sciences et techniques du vin. 719 pp. Dunod, Paris.
- SEFTON M. A., FRANCIS I. L., POCOCK K. F., WILLIAMS P. J. (1993). The influence of natural seasoning on the concentrations of eugenol, vanillin and cis-trans- β -methyl- γ -octalactone extracted from French and American oak wood. *Sci. Aliments*, **13**, 629-643.
- SINGLETON V. L. (1974). Some aspects of wooden container as a factor in wine maturation. Chemistry of wine making. 311 pp. ACS series n° 137, Webb A. D. (Ed.), ACS Pub. Co, New York.
- SPILLMAN P. J., ILAND P. G., SEFTON M. A. (1998). Accumulation of volatile oak compounds in a model wine stored in American and Limousin oak barrels. *Aust. J. of Grape Wine Res.*, **4**, 67-73.

CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E FENÓLICA DE VINHOS BRANCOS MONOVARIETAIS DA REGIÃO DEMARCADA DO DOURO

Sílvia TEIXEIRA ^{1,2,3}; Fernando M. NUNES ²; Sofia FRADIQUE¹; Fernanda COSME ³; Alice VILELA³

RESUMO

As castas Malvasia Fina e Gouveio da Região Demarcada do Douro originam vinhos com propriedades organoléticas muito características. A casta Malvasia Fina caracteriza-se, por dar origem a um vinho elegante e fino, com pouca intensidade e complexidade, tanto no aroma como no gosto. Já a casta Gouveio por sua vez caracteriza-se, por originar um vinho de cor citrina, frutado, fresco, vivo e com riqueza ácida. Assim, foi o objetivo do presente trabalho avaliar a composição físico-química e sensorial dos vinhos brancos provenientes das castas Malvasia Fina e Gouveio, vinificados em cubas de aço inoxidável e em barricas de madeira. Pretende-se com o presente trabalho ter um melhor conhecimento do impacto da vasilha de vinificação na qualidade final dos vinhos produzidos a partir destas duas castas.

Os resultados obtidos mostram que os vinhos vinificados em barricas de madeira apresentam um teor mais elevado de compostos fenólicos totais. Contudo, os vinhos monovarietais da casta Gouveio apresentam teores de compostos fenólicos totais superiores independentemente da vasilha de vinificação. Após análise de componentes principais foi possível discriminar os vinhos em três grupos em função da casta e da vasilha de vinificação.

Palavras chave: vinho branco, Gouveio, Malvasia Fina, composição fenólica, perfil sensorial.

¹ Adega Cooperativa de Murça, CRL Rua Francisco Barros Carneiro Lopes, 4 5090-134 Murça, Portugal.

² Centro de Química de Vila Real (CQ-UTAD), Departamento de Química, Escola da Ciência da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal. Email: fnunes@utad.pt.

³ Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genómica e Biotecnologia (IBB-CGB/UTAD), Departamento de Biologia e Ambiente, Escola da Ciência da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Edifício de Enologia 5001-801 Vila Real. Email: fcosme@utad.pt; avimoura@utad.pt

1 – INTRODUÇÃO

O uso da madeira de carvalho pode desempenhar um papel importante na produção de vinho, por ter um efeito no vinho resultante em termos de cor, sabor, perfil tanino e textura. O contacto da madeira de carvalho com os vinhos fornece a estes notas aromáticas que são muito apreciadas, tais como, coco, baunilha, cravo, madeira e fumo (GARDE-CERDÁN *et al.* 2010), bem como taninos. Além disso, a vinificação e o envelhecimento do vinho em barricas de madeira leva a oxidação suave de certos compostos, resultando em redução da adstringência e amargura, estabilização da cor, e desaparecimento de aromas vegetativo-herbáceas excessivos (GARDE-CERDÁN e ANCÍN-AZPILICUETA 2006). No entanto, a vinificação/envelhecimento do vinho em barricas de madeira também tem algumas desvantagens: o preço elevado das barricas, a exigência de muito espaço na adega e a duração limitada das mesmas (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2011). A sua higienização também é mais difícil que a das cubas de aço inoxidável.

Ainda assim, para intensificar as características aromáticas e de sabor dos vinhos brancos, um dos métodos mais utilizado é a vinificação em barricas de carvalho, apresentando estas características diferentes dos vinhos vinificados em cubas de aço inoxidável. A vinificação de vinhos brancos em madeira é, segundo IBERN-GOMÉZ *et al.* (2001), uma forma de os tornar mais complexos no *flavour* adquirindo novos sabores e aromas, como por exemplo, de compostos fenólicos voláteis e não voláteis que vão contribuir para o seu perfil sensorial distinto, o qual é considerado um factor de qualidade. Uma das características dos vinhos brancos que são vinificados em madeira de carvalho é apresentarem uma cor pálida. Contudo, o uso de barricas de madeira não é, no entanto, adequado a todos os vinhos (HERNANDEZ-ORTE *et al.* 2009; LIBERATORE 2010) principalmente por os aromas e sabores provenientes da madeira, que resultam da migração de compostos da madeira para o vinho, poderem dominar sobre os outros.

Assim, de forma a contribuir para um aprofundamento do comportamento dos mostos provenientes das castas Malvasia Fina e Gouveio da Região Demarcada do Douro, que originam vinhos com propriedades organolépticas muito próprias, foi objetivo deste trabalho avaliar a composição físico-química, fenólica e sensorial dos vinhos brancos provenientes dessas castas, vinificados em barricas de carvalho e cubas de aço inoxidável. Pretendeu-se assim ter um melhor conhecimento do impacto da vasilha de vinificação na qualidade sensorial dos vinhos produzidos a partir destas duas castas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Vinhos

Foram utilizados no presente estudo dois vinhos monovarietais brancos das castas Malvasia Fina e Gouveio (colheita de 2011), produzidos na Região Demarcada do Douro, sub-região cima Corgo. Os mostos das duas castas foram vinificados em cubas de aço inoxidável e barricas de madeira de carvalho. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado.

2.2 - Análise dos parâmetros enológicos convencionais

Teor alcoólico % (v/v), densidade, pH, acidez total, acidez volátil, sulfuroso livre e total foram determinados de acordo com os métodos descritos pela OIV (2012).

2.3 – Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

Para avaliação da composição fenólica, das amostras efetuou-se a determinação dos compostos fenólicos totais (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 1982), compostos fenólicos flavonóides e compostos fenólicos não flavonóides (KRAMLING e SINGLETON, 1969), Todas as determinações foram efetuadas em duplicado.

2.4 – Características cromáticas e cor

Os espectros de absorção das amostras de vinho foram registados com um espectrofotómetro numa gama de 380-770 nm, utilizando uma células de quartzo de 1 centímetro de percurso. Os dados das características cromáticas foram recolhidos para determinar a medida de L* (%) (luminosidade), a* (coordenada da cromaticidade vermelha) e b* (coordenada da cromaticidade amarela) de acordo com o método da OIV (2012). A cor dos vinhos foi determinada pela absorção a 420 nm também de acordo com os métodos da OIV (2012).

2.5 - Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por um painel treinado. As amostras foram apresentadas ao painel em copos de prova (ISO 3591:1977), marcados com três dígitos e numa ordem aleatória. Treze atributos foram selecionados: aspeto (intensidade da cor, limpidez), aroma (frutado, floral, herbáceo, especiarias, químico) e flavor (doce, ácido, adstrin-

gente, persistência, corpo, equilíbrio do flavor). Os atributos foram quantificados através de uma escala de intensidade de cinco pontos (ISO 4121:2003). Todas as avaliações foram realizadas entre as 10:00 e as 12:00 num laboratório devidamente equipado para a análise sensorial (ISO 8589:2007).

2.6 - Análise estatística

Tanto os dados das análises físico-químicas como os dados da análise sensorial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica versão 10. As diferenças entre os valores médios foram efetuadas com o teste Tukey ($p < 0,05$) para os dados das análises físico-químicas Os dados da análise sensorial foram analisados com recurso à Análise em Componentes Principais (ACP) aplicando o mesmo programa de análise estatística com o intuito de diferenciar os vinhos em função da casta e da vasilha de vinificação.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Efeito da casta e da vasilha de vinificação nas características físico-químicas, composição fenólica e características cromáticas dos vinhos

O Quadro 1 apresenta os dados das características físico-químicas dos vinhos Malvasia Fina e Gouveio vinificados em aço inoxidável e em barrica de carvalho. Observa-se que a acidez total foi sempre significativamente superior nos vinhos vinificados em barricas de carvalho em comparação com os vinhos vinificados em cubas de aço inoxidável, independentemente da casta utilizada.

Quadro1 – Características físico-químicas dos vinhos das castas Malvasia Fina e Gouveio vinificados em cubas de aço inoxidável e em barricas de carvalho.

Vinhos	Massa volúmica (g/mL)	[Etanol] (% v/v)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	SO ₂ livre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH
Malvasia Fina (Aço inoxidável)	0,9894±0,0000 ^a	12,4±0,0 ^b	0,23±0,00 ^a	5,15±0,04 ^a	36±1 ^b	120±2 ^b	3,14±0,01 ^a
Malvasia Fina (Madeira)	0,9910±0,0000 ^a	12,2±0,0 ^a	0,39±0,01 ^b	6,30±0,04 ^b	25±1 ^a	152±1 ^c	3,19±0,00 ^b
Gouveio (Aço inoxidável)	0,9909±0,0000 ^a	12,5±0,0 ^b	0,52±0,01 ^c	5,30±0,01 ^a	36±2 ^b	151±2 ^c	3,18±0,01 ^b
Gouveio (Madeira)	0,9903±0,0000 ^b	12,6±0,0 ^c	0,54±0,01 ^c	6,29±0,02 ^b	26±1 ^a	140±1 ^b	3,15±0,01 ^a

Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey)

Os vinhos vinificados em madeira de carvalho apresentaram teores significativamente superiores de compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides independentemente da casta. Este facto poderá estar relacionado com a extração de compostos fenólicos da madeira (Quadro 2). Contudo, os vinhos provenientes da casta Gouveio apresentaram teores significativamente superiores em compostos fenólicos totais e flavonóides quando vinificados em cubas de aço inoxidável comparativamente aos vinhos obtidos da casta Malvasia Fina.

Quadro 2 – Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides, taninos totais e índice de gelatina dos vinhos das castas Malvasia Fina e Gouveio vinificados em cubas de aço inoxidável e em barricas de carvalho.

<i>Vinhos</i>	Não flavonóides (mg/L ácido gálico)	Flavonóides (mg/L ácido gálico)	Fenólicos totais (mg/L ácido gálico)	Taninos totais (g/L)	Índice de gelatina
Malvasia Fina (Aço inoxidável)	96±2 ^b	125±1 ^a	221±1 ^a	0,1±0,0 ^a	1,72
Malvasia Fina (Madeira)	162±1 ^d	316±7 ^c	478±0 ^d	0,2±0,0 ^b	4,95
Gouveio (Aço inoxidável)	84±0 ^b	161±4 ^b	245±4 ^b	0,2±0,0 ^b	3,60
Gouveio (Madeira)	105±1 ^c	301±6 ^c	407±7 ^c	0,3±0,0 ^c	4,95

Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey)

O índice de gelatina é baseado na capacidade dos taninos reagirem com as proteínas, formando combinações estáveis. Esta reatividade é responsável pela sensação de adstringência. O índice de gelatina obtido para estes vinhos é baixo, contudo é superior nos vinhos vinificados em vasilha de madeira (Quadro 2), o que está de acordo com os valores de taninos determinados.

Quer o vinho obtido da casta Malvasia Fina quer o obtido da casta Gouveio quando vinificados em cubas de aço inoxidável mostram valores significativamente mais elevados de luminosidade (L^* (%)). Já a cor (absorvância a 420nm), é significativamente mais elevada nos vinhos que foram vinificados em vasilhas de madeira, independentemente da casta, o que está em acordo com a coordenada b^* (cor amarela) determinada pelo método CIELab (Quadro 3).

Quadro 3 – Características cromáticas ($L^*(\%)$, a^* , b^*) e cor dos vinhos das castas Malvasia Fina e Gouveio vinificados em cubas de aço inoxidável e em barricas de carvalho.

Vinhos	$L^*(\%)$	a^*	b^*	Cor
Malvasia Fina (Aço inoxidável)	99,6±0,0 ^b	-1,42±0,11 ^b	3,83±0,05 ^a	0,351±0,001 ^a
Malvasia Fina (Madeira)	91,8±0,1 ^a	-1,54±0,04 ^b	10,31±0,08 ^c	0,481±0,000 ^c
Gouveio (Aço inoxidável)	97,4±0,1 ^b	0,37±0,02 ^a	4,57±0,04 ^b	0,361±0,007 ^b
Gouveio (Madeira)	93,3±0,3 ^a	-1,56±0,01 ^b	10,03±0,27 ^c	0,465±0,009 ^c

Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey)

3.2 - Efeito da casta e da vasilha de vinificação nas características sensoriais dos vinhos

O perfil sensorial de cada um dos vinhos é mostrado graficamente na Figura 1 em que a média dos valores atribuídos pelos provadores a cada atributo (cor, limpidez, aroma frutado, aroma floral, aroma herbáceo, aroma especiarias, aroma químico, doce, ácido, adstringente, corpo, equilíbrio gustativo e persistência) é marcado no eixo correspondente. O centro da figura representa o ponto de menor valor da escala utilizada na avaliação, enquanto a intensidade aumenta do centro para a periferia. O perfil sensorial revela-se quando se faz a conexão dos pontos. Pela análise do gráfico (Figura 1) verificamos que o vinho da casta Malvasia Fina vinificada em madeira, se destaca pelos descritores *cor* e *especiarias* e na vinificação em cubas de aço inoxidável pelos descritores *corpo*, *equilíbrio*, *persistência*, *limpidez*, *aroma frutado* e *aroma floral*.

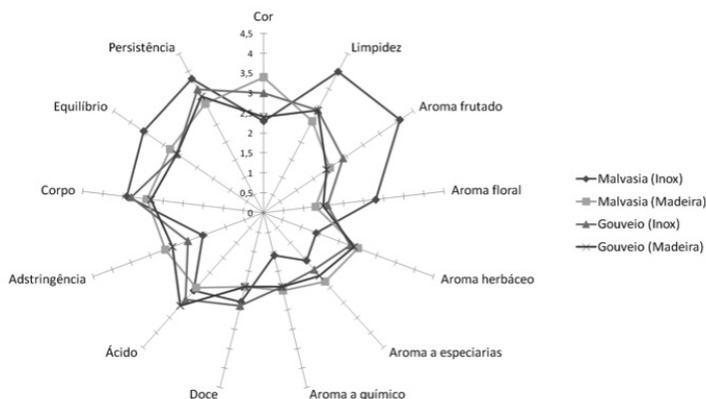


Figura 1 – Perfil sensorial das quatro amostras de vinho em estudo.

Os vinhos da casta Gouveio vinificados em Madeira e em cubas de aço inoxidável apresentam um perfil organoléptico onde nenhum dos descritores avaliados se apresenta como mais relevante.

Para melhor compreender o impacto da vasilha de vinificação na qualidade sensorial dos vinhos produzidos a partir destas duas castas (Malvasia Fina e Gouveio) efetuou-se uma análise em componentes principais (Figura 2).

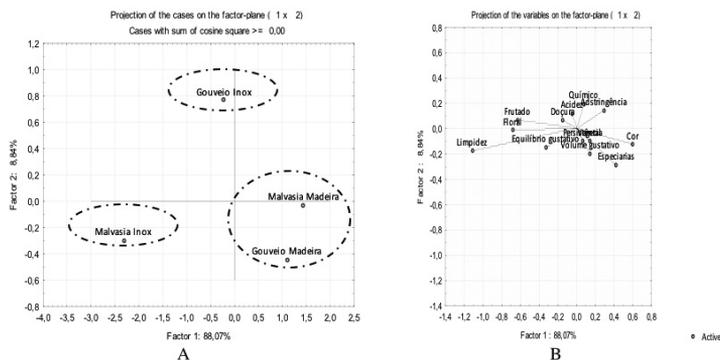


Figura 2 – Projeção da *cov-ACP* das amostras dos vinhos das castas Malvasia Fina e Gouveio, vinificadas em cubas de aço inoxidável e barricas de carvalho, avaliadas sensorialmente (A). Projeção da *cov-ACP* dos atributos sensoriais avaliados nas mesmas amostras de vinho (B).

Avaliando a projeção da Figura 2 (A) verificamos que a Componente Principal 1 foi quem mais contribuiu para agrupar os vinhos vinificados em vasilha de madeira, enquanto que a Componentes Principal 2 explica a distância dos vinhos das castas Gouveio e Malvasia Fina vinificados em cubas de aço inoxidável. Dentre os atributos sensoriais analisados, o caráter *limpidez* foi quem mais contribuiu para a Componente Principal 1 enquanto que para a Componente Principal 2 foi o descritor *aroma a especiarias* que deu a maior contribuição (Figura 2 - B). O aroma a especiarias caracteriza os vinhos da casta Malvasia Fina, quando vinificado em madeira (Figura 1). Alguns compostos voláteis da madeira que podem influenciar o aroma do vinho como os fenois voláteis (4-etilfenol, 4-etilguaiaacol e a vanilina - aroma a baunilha) podem, também, conferir um certo aroma a “especiarias” (DÍAZ-PLAZA *et al.* 2002; BOZALONGO *et al.* 2007).

4 – CONCLUSÕES

Quando vinificados em madeira (barricas de Carvalho) os vinhos de ambas as castas apresentam características organolépticas semelhantes, provavelmente devido à influência dos compostos aromáticos cedidos pela madeira ao vinho, durante a vinificação. Esses compostos sobrepoem-se ao aromas característicos de cada casta. A vinificação em cubas de aço inoxidável parece favorecer as características sensoriais próprias de ambas as castas permitindo a sua distinção. A casta Malvasia Fina, vinificada em cubas de aço inoxidável, apresenta como característica organoléptica a *limpidez e os aromas frutados e florais* e a casta Gouveio, mais apagada a nível de aromas, caracteriza-se pelos descritores *químico e acidez*. Contudo, a vinificação de vinhos brancos em vasilhas de madeira poderá ser uma forma de encontrar novos produtos que possam satisfazer os diferentes gostos dos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOZALONGO R.; CARRILLO J.D.; FERNÁNDEZ TORROBA M.A.; TENA M.T. (2007). Analysis of French and American Oak Chips with Different Toasting Degrees by Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1173(1-2), 10-17.
- CHATONNET P.; DUBORDIEU D. (1998). Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for production of barrels used in barrel aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 79-85.
- DÍAZ-PLAZA E. M.; REYERO J. R.; PARGO F.; ALONZO G. L.; SALINAS M. R. (2002). Influence of Oak Wood on the Aromatic Composition and Quality of Wines with Different Tannin Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2622-2626.
- GARDE-CERDÁN T.; ANCÍN-AZPILICUETA C. (2006). Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 199-205.
- GARDE-CERDÁN T.; LORENZO C.; CAROT J. M.; ESTEVE M. D.; CLIMENT M. D.; SALINAS M. R. (2010). Effects of composition, storage time, geographic origin and oak type on the accumulation of some volatile oak compounds and ethylphenols in wines. *Food Chemistry*, 122, 1076-1082.
- HERNANDÉZ-ORTE P.; LAPEÑA A.C.; ESCUDERO A.; ASTRAIN J.; BARON C.; PARDO I.; POLO L.; FERRER S.; CACHO J.; FERREIRA V. (2009). Effect of micro-oxygenation on

- the evolution of aromatic compounds in wines: Malolatic fermentation and ageing in wood. *Food Science and Technology - Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 42, 391-401.
- IBERN-GÓMEZ M.; ANDRÉS-LACUEVA C.; LAMUELA-RAVENTÓS R. M.; LAO-LUQUE C.; BUXADERAS S.; DE LA TORRE-BORONAT M. C. (2001). Differences in phenolic profile between oak wood and stainless steel fermentation in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 159-164.
- ISO 3591:1977 - Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=9002
- ISO 4121:2003 - Sensory analysis -- Guidelines for the use of quantitative response scales. <http://www.iso.org/iso/search.htm?q=ISO+4121%3A2003&searchSubmit=Search&sort=rel&type=simple&published=on>
- ISO 85 89:2007 -Sensory analysis -- General guidance for the design of test rooms. http://www.iso.org/iso/catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36385.
- KRAMLING e SINGLETON, (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92
- LIBERATORE M. T.; PATI S.; DEL NOBILE M. A.; LA NOTTE E. (2010). Aroma quality improvement of Chardonnay white wine by fermentation and ageing in barrique on lees. *Food Research International*, 43, 996-1002.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). (2012). *Récueil de Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts*. Edition Officielle. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P.; PEYNAUD E.; SUDRAUD P. (1982). *Science et Techniques du vin*. Tome 4. Dunod: Paris.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ P.; GÓMEZ-PLAZA E. (2011). Differences in the extraction of volatile compounds from oak chips in wine and model solutions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 127-132.

EFEECTO DE TRATAMIENTOS FOLIARES DE EUGENOL, GUAYACOL Y WHISKYLACTONAS SOBRE LOS PRECURSORES AROMÁTICOS GLICOSÍDICOS DE LAS UVAS Y SUS VINOS

Ana I. PARDO-GARCÍA¹; Kortes SERRANO DE LA HOZ¹; Ana M. MARTÍNEZ-GIL¹; Amaya ZALACAIN¹; Gonzalo L. ALONSO¹; M. Rosario SALINAS^{1*}

RESUMEN

Se sabe que la aplicación de extractos de roble a las viñas modifica la composición volátil de las uvas y de sus vinos. Eugenol, guayacol y whiskylactonas son componentes volátiles del extracto de roble, por ello su aplicación a las viñas nos sirven como referencia. En este trabajo se realizaron aplicaciones foliares a las viñas de disoluciones de estos compuestos y se analizó el potencial aromático de las uvas mediante el análisis de la glucosa G-G por HPLC-RID. Con estas uvas se elaboraron vinos en los que se analizó la composición volátil por SBSE-GC-MS y también se evaluaron mediante un análisis sensorial. Los resultados mostraron que los tratamientos aumentaron la cantidad de precursores aromáticos glicosídicos de la uva y que se modificó consecuentemente la composición volátil y el perfil sensorial aromático de los vinos elaborados.

Palabras clave: potencial aromático, uvas, vinos, eugenol, guayacol, whiskylactonas

INTRODUCCIÓN

La percepción aromática del vino es uno de los parámetros de calidad más importantes a la hora de evaluar y consumir un vino. Los compuestos químicos que determinan el aroma del vino tienen tres orígenes diferentes: los característicos de la variedad de uva (aromas primarios), los que se producen en el proceso de vinificación (aromas secundarios) y los que se originan durante el envejecimiento del vino terminado (aromas terciarios). El aroma varietal consta de un grupo muy complejo de sustancias que pueden presentarse en forma libre (moléculas volátiles y por tanto olorosas), o como precursores (moléculas que no huelen), entre los que abundan los precursores glicosídicos. Estos últimos constituyen un importante potencial del aroma del vino, ya que durante el pro-

ceso de vinificación y a lo largo del envejecimiento, se pueden ir transformando en moléculas olorosas. La concentración de estos aromas varietales está modulada por las condiciones edafoclimáticas y culturales de la zona, agrupados como “efecto terroir”, que da lugar a vinos con características y origen identificable (DELOIRE *et al.*, 2005). En varios estudios se ha puesto de manifiesto que uvas procedentes de viñas cultivadas próximas a lugares en los que hubo incendios forestales, produjeron vinos que tenían aroma a humo (KENNISON *et al.*, 2008). Recientes estudios han demostrado que cuando se aplica un extracto de roble a la viña los compuestos volátiles del extracto son asimilados por la uva y están presentes en los vinos elaborados con ellas (MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2012). También se ha puesto de manifiesto, mediante el análisis de sus agliconas por cromatografía de gases, que la composición glicosídica de las uvas se modificó con los tratamientos foliares de extracto (MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2013). Algunos estudios sugieren que la glicosilación de volátiles en la planta es una forma de acumular estos compuestos, limitando así su toxicidad (WINTERHALTER & SKOUROUMOUNIS, 1997). De esta manera, los compuestos exógenos a la viña pueden contribuir formando parte de los precursores glicosídicos presentes en las uvas, que más tarde darán las agliconas olorosas mediante procesos de hidrólisis o enzimáticos (GÜNATA *et al.*, 1985).

El extracto de roble está compuesto por diversos volátiles como eugenol, guayacol y whiskylactonas, entre otros compuestos que pueden ser asimilados por las plantas y acumulados en las uvas, como se ha observado después de realizar aplicaciones foliares, lo que sugiere que podrán modificar la concentración de los precursores aromáticos glicosídicos presentes en las uvas. Las whiskylactonas carecen del grupo hidroxilo necesario para formar el enlace glicosídico con el azúcar y formar el precursor aromático, pero para este fin, se produce una apertura del anillo produciendo su isómero con grupo hidroxilo (HAYASAKA *et al.*, 2007; WINTERHALTER, 2009).

En este trabajo, se evalúa la variación del potencial aromático glicosídico de uvas Monastrell, después del tratamiento foliar de las viñas con disoluciones acuosas de eugenol, guaiacol, cis y trans whiskylactonas, mediante la determinación de la glucosa liberada de sus precursores por cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-IR) (SALINAS *et al.*, 2012). A partir de estas uvas se ela-

boraron sus vinos correspondientes, a los que se analizó su composición aromática por SBSE-GC-MS y se realizó también un análisis sensorial en tres momentos diferentes (después de la fermentación alcohólica, después de la maloláctica y al cabo de 6 meses en botella).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

La experiencia se realizó durante la campaña de 2010 en cepas de Monastrell (*Vitis vinifera* cv), de 8 años de edad, cultivadas en espaldera en la parcela experimental de la BSI de Jumilla (D.O. Jumilla).

3.2. Disoluciones

Las disoluciones de eugenol, guayacol, cis y trans whiskylactonas se prepararon a partir de sus estándares comerciales (Sigma-Aldrich, Gillingham, England).

3.3. Tratamientos

Los tratamientos se realizaron en enero, mediante una aplicación foliar. Las disoluciones se aplicaron a las plantas con un pulverizador de mochila, quedando toda la parte foliar de la vid mojada. Se realizaron 4 tratamientos: E (disolución de eugenol (6% (v/v)), G (disolución de eugenol (6% (v/v)), E+G (disolución de eugenol y guayacol (0.6 % (v/v) cada uno)), W (disolución de whiskylactonas (6% (v/v))). Cada tratamiento se efectuó sobre 16 plantas de la misma fila, dejando una sin tratar entre cada uno de ellos, para evitar posibles contaminaciones. Además, se dejó una fila adicional para el control. Previamente a la aplicación se añadió a las disoluciones un coadyuvante (Fluvious, BASF, España) para facilitar la adherencia y penetración del extracto. Se dosificó a razón 0,25 mL Fluvious/ 1L de extracto a aplicar. Cada planta fue tratada, aproximadamente, con 300 mL de disolución. Los tratamientos se realizaron cuando la temperatura ambiente era inferior a 20 °C, sobre las 8 de la mañana.

3.4. Vinificación

Las uvas se recolectaron manualmente, en perfecto estado sanitario, con una madurez tecnológica en torno a 2.5 (°Baumé /acidez total (g/L ácido tartárico)). La uva se procesó siguiendo el sistema tradicional de vinificación en tinto. De cada tratamiento se elaboraron 15 L de vino en duplicado en depósitos de acero inoxidable de 30 L. La fermentación alcohólica transcurrió a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se inocularon 20g/hL de levaduras seleccionadas, cepa UCLM S377 (Springer Oenologie). Finalizada la fermentación alcohólica se trasegaron los vinos a recipientes de 5L y se inocularon 8g/hL de bacterias, Lall II-4 (Lallemand), para llevar a cabo la fermentación maloláctica y completar así la vinificación. Posteriormente los vinos se sulfitaron hasta 8g/hL de SO_2 total y se embotellaron para su conservación.

3.5. Análisis de precursores

Se determinó mediante el análisis de la glucosa glicosídica (glucosa G-G) liberada por hidrólisis ácida de los precursores aromáticos glicosídicos, valiéndonos de un HPLC provisto de un detector de índice de refracción siguiendo el método de SALINAS *et al.*, (2012). De cada muestra se prepararon dos extractos diferentes, sustituyendo las dos horas de maceración por una extracción con microondas, utilizando para ello un sistema de microondas NEOS. Posteriormente se siguieron las siguientes etapas: eliminación de los polifenoles glicosilados y aislamiento de los precursores glicosilados del aroma, eliminación de la glucosa libre, hidrólisis ácida de los precursores y análisis por HPLC-IR. Cada extracto se analizó por duplicado.

3.6. Análisis de volátiles

Se siguió el método de MARÍN *et al.* (2005), basado en la SBSE-GC-MS y el empleo de un twister de 10 x 0,5 mm (Gerstel, Mülheim a/d Ruhr, Alemania). A 25 mL de vino se añadió 3-metil-1-pentanol como SI y a continuación se realizó la absorción por inmersión del twister con agitación de 500 rpm durante 60 minutos y temperatura de 25°C . Los analitos desorbidos fueron transferidos al cromatógrafo de gases (Agilent 7890A GC-5975C insert XL MDS). Los volátiles se identificaron y cuantificaron usando rectas de calibrado de los patrones comerciales y utilizando la librería NIST del equipo analítico.

3.7. Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial olfativo descriptivo de cada vino. El panel de cata lo formaron 8 jueces expertos, de entre 30-55 años. Las catas se realizaron al finalizar la fermentación alcohólica, después de la maloláctica y a los 6 meses de permanecer el vino en botella, por lo que de cada tratamiento y catador se recogieron seis fichas de cata. Los descriptores se puntuaron desde 1 (ausencia) hasta 7 (máxima presencia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra la concentración de glucosa G-G (\diamond) de los precursores aromáticos tras liberarse la aglicona volátil. Se observa que las uvas procedentes de los tratamientos de las viñas con los compuestos de referencia (E, G, E+G y W) tienen mayor cantidad de glucosa G-G que el control. Los tratamientos afectaron de manera significativa a la concentración de precursores, lo que apoya, que al menos gran parte de estos volátiles fueron absorbidos por la planta y acumulados en la uva en forma de precursores glicosilados. La cantidad de cada compuesto glicosilado no fue determinada, ya que para ello es necesario tener patrones de los mismos pero no existen en el comercio. No obstante, este método nos da una medida cuantitativa de los precursores aromáticos, que posteriormente podrán liberar sus agliconas volátiles en el vino. Las barras de la Figura 1 representan la concentración de los volátiles de origen varietal que hay en los vinos procedentes de estas uvas.

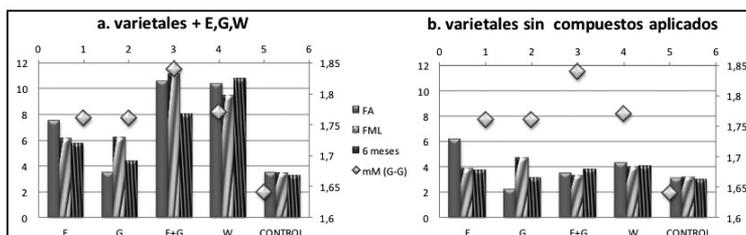


Figura 1- Relación entre la concentración de glucosa G-G (\diamond) y la concentración de volátiles ($\mu\text{mol/L}$) de procedencia varietal de los vinos (a. teniendo en cuenta los compuestos aplicados, b. sin tener en cuenta los compuestos aplicados).

En la Figura 1.a. se han tenido en cuenta las concentraciones de los compuestos aplicados, junto con los de origen varietal y se observa que hay una relación entre los volátiles determinados mediante GC y la concentración de glucosa G-G de las uvas. Los vinos procedentes de los tratamientos tuvieron mayor concentración de estos volátiles que el control, siendo mayor su concentración en los vinos del tratamiento E+G. Cuando no tenemos en cuenta los compuestos aplicados (eugenol, guayacol y whiskylactonas) para calcular la concentración total de los volátiles varietales (Figura 1.b), vemos que todos los vinos procedentes de los tratamientos tienen mayor concentración de estos compuestos, al menos en algún punto de muestreo, aunque las diferencias son menores y el comportamiento diferente. Estos resultados sugieren que la aplicación de formulaciones con compuestos volátiles exógenos a la viña, como eugenol, guayacol y whiskylactonas, afecta a la composición volátil de los vinos en dos sentidos: incrementa considerablemente la concentración de los volátiles aplicados y modifica la de otros volátiles. En la Tabla 1 se muestran los compuestos analizados, junto a su umbral de percepción olfativa. En la Figura 2 se muestra el VA (valor de aroma) correspondiente a los volátiles aplicados (2.a.) y a los volátiles varietales (2.b). El VA nos da una idea de la importancia que tienen estos compuestos en el aroma global del vino, siendo mayor cuanto mayor es su VA y nos permite evaluar de manera sencilla los datos obtenidos a partir del análisis cuantitativo expresado como información sensorial. Los aromas varietales constituyen entre un 70-85% del VA total de los compuestos analizados (fermentativos, fruta, varietales). La cantidad de eugenol, guayacol y whiskylactonas aumentó de manera significativa en los vinos procedentes de los tratamientos, lo que nos hace pensar que darán sus notas características a los vinos. La suma de VA de los varietales (1.b) sigue la misma tendencia que la concentración, siendo más aromáticos los vinos procedentes de los tratamientos que el control, especialmente para el procedente del tratamiento E+G.

Tabla 1- Compuestos analizados y umbral de percepción olfativo (U.P.O.)

Compuesto	U.P.O. (µg/L)
Guayacol	9.5
E-whiskylactona	370
Z-whiskylactona	54
Eugenol	6
Linalol	15
Citronellol	100
Nerol	15
β-Damascenona	0.05
Geraniol	30
Geranyl acetona	60
β-Ionona	5
Nerolidol	15
Farnesol c	1000
Vanillato de etilo	990
Cinamato de etilo	1.1
Dihidroxicinamato de etilo	1.6

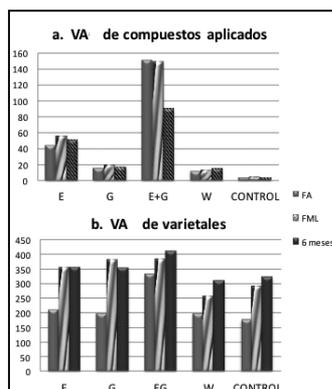


Figura 2- VA total de volátiles de compuestos aplicados (1.a), aromas varietales (1.b) de los vinos después de la fermentación alcohólica, maloláctica y después de 6 meses.

En la Figura 3 se muestra el análisis sensorial olfativo de los vinos estudiados en los diferentes muestreos. Se observa que en todos los muestreos los catadores apreciaron diferencias entre los vinos, puntuando con mayor intensidad aromática los vinos procedentes de los tratamientos. Estos vinos también fueron los que mayores puntuaciones obtuvieron en los descriptores clavo y madera/roble. Eugenol y guayacol aportan notas a especia, clavo y ahumado y su aroma detectable en el vino se relaciona tras su contacto con la madera, quizás por eso estos vinos también obtuvieron grandes puntuaciones del descriptor madera/roble.

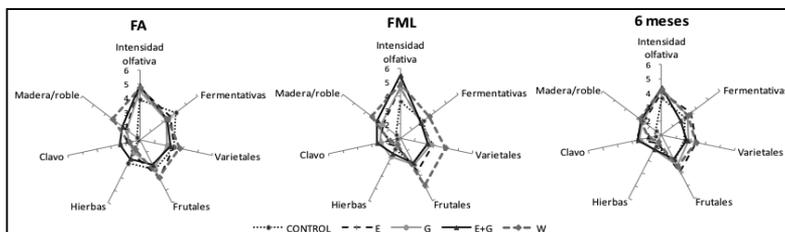


Figura 3- Análisis sensorial olfativo de los vinos elaborados.

La presencia de whisky lactonas (cuyos descriptores son coco y madera/roble) fue apreciada en los vinos que provienen de las uvas tratadas con W, estos obtuvieron las mayores puntuaciones de la nota madera/roble. Otro aspecto a destacar en el análisis sensorial es que aunque el VA total de los aromas varietales en vinos del tratamiento de W no es el mayor, los catadores destacaron a estos vinos como los más afrutados y con más notas varietales, especialmente después de la fermentación maloláctica. Este hecho puede ser explicado por la complejidad aromática que engloba al conjunto de volátiles de un vino y a los efectos de interacción que hay entre ellos. Concretamente la trans-whisky lactona está considerada como un compuesto impacto (BOIDRON *et al.*, 1988) que puede romper el buffer aromático del vino, de forma que le confiere diferentes notas aromáticas. El trabajo ha demostrado que hay una relación directa entre la cuantificación de la glucosa G-G en las uvas y la intensidad aromática de sus vinos. Las uvas de los tratamientos tenían mayor cantidad de precursores aromáticos y dieron vinos de mayor intensidad aromática. La aplicación de eugenol, guayacol y whisky lactonas a las viñas incrementa la concentración de los precursores glicosídicos de la uva, y como consecuencia, modifica la composición volátil de los vinos, dando un perfil aromático diferenciado asociado a esas sustancias exógenas. Estos compuestos se incorporaron a la uva en forma de precursores glicosídicos y posteriormente liberan sus aglicona volátil al vino, al que le pueden comunicar su aroma. Por tanto, la determinación del potencial aromático glicosídico de la uva por HPLC-IR es una herramienta sencilla que da una información valiosa para predecir la intensidad aromática varietal que tendrá un vino.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al MICINN la concesión del proyecto de ref.: AGL2009-08950 que ha permitido financiar, en colaboración con fondos FEDER, este trabajo y la beca FPI (BES-2010-038613) de A.I.P.-G. También agradecemos a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la beca FPI de A.M.M.-G (EXP 422/09). Agradecemos a la empresa Protea France S.A.S. por el suministro del extracto de roble.

BIBLIOGRAFÍA

- BOIDRON J.N.; CHATONNET, P.; PONS, M. (1988) Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 22, 275-294.
- DELOIRE, A.; VAUDOUR, E.; CAREY, V.; BONNARDOT, V.; VAN LEEUWEN, C. (2005) Grapevine responses to terroir: A global approach. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39, 149-162.
- GUNATA, Y.Z.; BAYONOVE, C.L.; BAUMES, R.L.; CORDONNIER, R.E. (1985) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A* 331, 83-90.
- HAYASAKA, Y.; WILKINSON, K.L.; ELSEY, G.M.; RAUNKJÆR, M.; SEFTON, M.A. (2007) Identification of natural oak lactone precursors in extracts of American and French oak woods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9195-9201.
- KENNISON, K.R.; GIBBERD, M.R.; POLLNITZ, A.P.; WILKINSON, K.L. (2008) Smoke-derived taint in wine: the release of smoke-derived volatile phenols during fermentation of Merlot juice following grapevine exposure to smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7379-7383.
- MARÍN, J.; ZALACAIN, A.; DE MIGUEL, C.; ALONSO, G.L.; SALINAS M.R. (2005) Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A* 1098, 1-6.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; ANGENIEUX, M.; PARDO-GARCÍA, A.I.; ALONSO, G.L.; OJEDA, H.; SALINAS M.R. (2013) Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines. *Food Chemistry* 138, 956-965.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; GARDE-CERDÁN, T.; MARTÍNEZ, L.; ALONSO, G.L.; SALINAS, M.R. (2011) Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3253-3263.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; GARDE-CERDÁN, T.; ZALACAIN, A.; PARDO-GARCÍA, A.I.; SALINAS, M.R. (2012) Applications of an oak extract on Petit Verdot grapevines. Influence on grape and wine volatile compounds. *Food Chemistry* 132, 1836-1845.
- SALINAS, M.R.; SERRANO DE LA HOZ, K.; ZALACAIN, A.; LARA, J.F.; GARDE-CERDÁN, T. (2012) Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification. *Talanta* 89, 396-400.
- WINTERHALTER, P. (2009) ASEV honorary research lecture 2008: Application of countercurrent chromatography for wine research and wine analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 123-129.
- WINTERHALTER, P. & SKOUROUMOUNIS, G.K. (1997) Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 55, 73-105.

DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS MONOVARIETAIS DAS CASTAS TOURIGA NACIONAL E ARAGONÊS PELO PERFIL ANTOCIÂNICO

Ema CALÇADA¹, Fernanda COSME² e Ana BARROS¹

RESUMO

O consumidor atual é cada vez mais exigente relativamente à garantia da origem e da composição do vinho que consome, sendo uma das preocupações do setor vitivinícola a correta identificação e caracterização de vinhos monovarietais. Por essa razão, é necessário estabelecer métodos objetivos para a caracterização dos vinhos com vista à normalização dos processos de controlo. A utilização de ferramentas analíticas adequadas para a autenticação de vinhos tintos monovarietais é essencial para este setor, uma vez que estes vinhos desempenham um papel fundamental a nível do mercado mundial. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil antociânico por HPLC de vinhos monovarietais das castas Aragonês e Touriga Nacional com o intuito de os discriminar. Os resultados obtidos permitiram identificar 15 antocianinas monoméricas, incluindo antocianinas monoglucosiladas, acetiladas e cumariladas em diferentes proporções, dependendo da casta.

Palavras-Chave: vinho, perfil antociânico, Touriga Nacional, Aragonês, análise em componentes principais

1 - INTRODUÇÃO

As antocianinas são os compostos fenólicos responsáveis pela cor das uvas e dos vinhos tintos, que podem ser associados à caracterização da casta, uma vez que são substâncias sintetizadas nas uvas (CRAVERO e DI STEFANO 1990). As condições ambientais sob as quais decorre o desenvolvimento do bago têm grande influência na quantidade de

¹ Centro de Química de Vila Real (CQ-UTAD), Departamento de Química, Escola da Ciência da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal. Email: abarros@utad.pt

² Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genómica e Biotecnologia (IBB-CGB/UTAD), Departamento de Biologia e Ambiente, Escola da Ciência da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Edifício de Enologia 5001-801 Vila Real. Email: fcosme@utad.pt

compostos responsáveis pela cor, mas a natureza e as percentagens relativas destas substâncias obedecem a um determinante genético que as torna mais ou menos constantes (CALÓ *et al.* 1994).

A procura de vinhos monovarietais tem tido um crescimento nos últimos anos, o que torna imperioso dispor de técnicas laboratoriais e ferramentas analíticas expeditas para poder certificar a sua autenticidade e consequentemente proteger os consumidores, especialmente quando o rótulo menciona a casta utilizada na vinificação desse vinho. Vários autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação do perfil de antocianinas de uvas e de vinhos tintos (OIV, 2003; BAER *et al.* 2008; OTTENEDER *et al.* 2001; AROZARENA *et al.* 2000a e b; REVILLA *et al.* 2001; BURNS *et al.* 2002; OTTENEDER *et al.* 2002; SCHWARZ *et al.* 2004), sendo possível a sua utilização para diferenciar as castas e consequentemente efetuar a autenticidade do vinho (ZHAO *et al.* 2010).

O objetivo deste trabalho foi identificar o perfil de antocianinas por HPLC de vinhos tintos monovarietais da casta Aragonês e Touriga Nacional de forma a verificar se seria possível diferenciá-los.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Vinhos

Foram analisados vinhos tintos jovens monovarietais da casta Aragonês e Touriga Nacional.

2.2 – Determinação e identificação das antocianinas monoméricas

As antocianinas monoméricas dos vinhos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo usado para o efeito um equipamento Dionex (3000 Dionex Corporation) equipado com um detector de fotodiodos. A coluna utilizada foi uma Teknocroma C-₁₈ com 250 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro e 5 mm de partícula (Teknocroma, Barcelona). A fase A - solução aquosa de ácido fórmico a 5 % e a fase B de metanol, ambos de qualidade analítica (Panreac). A água ultra-pura foi obtida a partir de um sistema de purificação de Mili-Q (Millipore). O gradiente usado foi de 5 % B, a 5 minutos, gradiente até 60 % de B em 60 minutos, 60 % B de 5 minutos. O

detector de fotodíodos operava entre 200-600 nm e o perfil cromatográfico foi registado a 520 nm. O volume injectado de amostra foi de 50 μ l e o fluxo de 1 mL/min, sendo a análise feita a 35 °C. Cada uma das antocianinas foi identificada de acordo com DALLAS e LAUREANO (1994), pela ordem de eluição, o tempo de retenção e espectros de ultravioleta visível. Todas as análises foram efectuadas em duplicado.

2.3 – Análise estatística

Para analisar as diferenças estatísticas entre o perfil de antocianinas, efectuou-se uma análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica versão 6. As diferenças entre os valores médios foi efetuada recorrendo ao teste Tukey ($p < 0,05$). A diferenciação das castas pelo perfil de antocianinas foi efetuada com recurso à análise em componentes principais recorrendo-se também ao programa Statistica versão 6.

3 - RESULTADOS

De forma a se poder identificar as diferentes antocianinas de cada amostra de vinho nos cromatogramas obtidos por HPLC, foi necessário determinar previamente os diferentes tempos de retenção das antocianinas separadas. Foram detectadas e identificadas 15 antocianina monoméricas nos vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional e Aragonês, cujos tempos de retenção se apresentam no Quadro 1.

Quadro 1 – Tempo de retenção (tr), das antocianinas detectadas nos vinhos das castas de Touriga Nacional e Aragonês estudados.

Antocianina	tr \pm DP (min)
delfinidina-3-monoglucósido	17,98 \pm 0,21
cianidina-3-monoglucósido	22,59 \pm 0,22
petunidina-3-monoglucósido	27,75 \pm 0,22
peonidina-3-monoglucósido	30,31 \pm 0,19
malvidina-3-monoglucósido	31,68 \pm 0,19
delfinidina-3-acetilglucósido	35,79 \pm 0,20
cianidina-3-acetilglucósido	36,98 \pm 0,20
petunidina-3-acetilglucósido	38,82 \pm 0,23
peonidina-3-acetilglucósido	40,17 \pm 0,19
malvidina-3-acetilglucósido	43,26 \pm 0,21
delfinidina-3- <i>p</i> -cumarilglucósido	45,15 \pm 0,21
cianidina-3- <i>p</i> -cumarilglucósido	45,85 \pm 0,26
petunidina-3- <i>p</i> -cumarilglucósido	46,15 \pm 0,23
peonidina-3- <i>p</i> -cumarilglucósido	47,26 \pm 0,21
malvidina-3- <i>p</i> -cumarilglucósido	49,61 \pm 0,20

DP – desvio padrão

A figura 1 mostra a percentagem de área da série das antocianinas monoglucosiladas, acetiladas e cumariladas determinadas nos vinhos monovarietais das duas castas. Foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os vinhos quanto à série das antocianinas monoglucósiladas e acetiladas. Verificou-se que os vinhos monovarietais das castas Aragonês apresentavam uma maior percentagem de área da série das antocianinas monoglucosiladas enquanto que os vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional apresentavam uma maior percentagem de área da série das antocianinas acetiladas. Relativamente à série das antocianinas cumariladas não foram encontradas diferenças significativas entre os vinhos das duas castas em estudo.

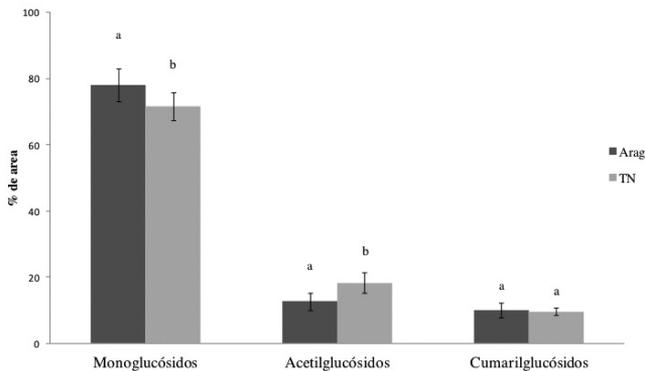


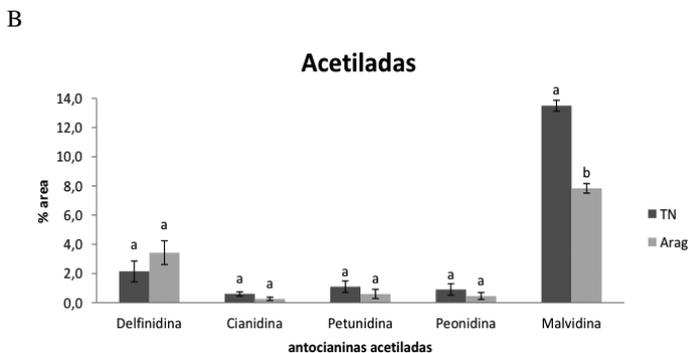
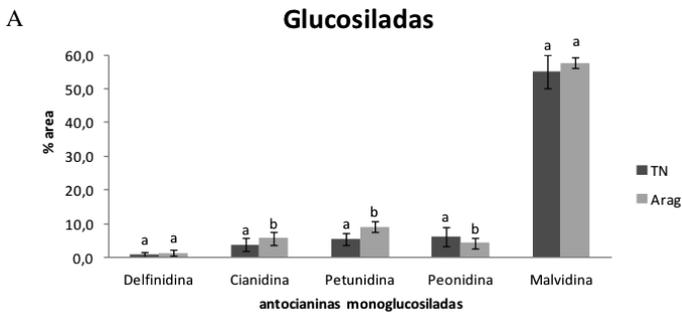
Figura 1 – Percentagem de área das séries de antocianinas monoglucósiladas, acetiladas e cumariladas dos vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional (TN) e Aragonês (Arag). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

A figura 2 mostra a percentagem de área das antocianinas monoméricas da série das antocianinas monoglucosiladas, acetiladas e cumariladas.

Na série das antocianinas monoglucosiladas, a cianidina-3-monoglucósido e a petunidina-3-monoglucósido são as antocianinas monoméricas que apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) na percentagem de área entre os vinhos vinificados da castas Touriga Nacional e Aragonês, sendo a sua percentagem superior nos vinhos vinificados a partir da casta Aragonês (figura 2A). Já a peonidina-3-monoglucósido apresentou uma percentagem de área significativamente superior nos vinhos vinificados da casta Touriga Nacional.

Na série das antocianinas acetiladas, apenas foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os vinhos provenientes das duas castas em estudo para a malvidina-3-acetilglucósido (13,5 e 7,8 % de área da malvidina-3-acetilglucósido no vinho da casta Touriga Nacional e Aragonês, respectivamente), sendo os vinhos vinificados a partir da casta Touriga Nacional mais ricos nesta antocianina (figura 2B).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas na percentagem de área da serie das antocianinas cumariladas (figura 1), quando se faz a analise tendo em consideração cada uma das antocianinas monoméricas desta série, pode constatar-se que existem diferenças significativas entre os vinhos das duas castas quanto à petunidina-*p*-cumarilglucósido, peonidina-*p*-cumarilglucósido e malvidina-*p*-cumarilglucósido, sendo a percentagem de área das duas primeiras superior nos vinhos vinificados da casta Aragonês (0,1 e 0,2 % de área da petunidina-*p*-cumarilglucósido, 0,6 e 1,3 de área da peonidina-*p*-cumarilglucósido no vinho da casta Touriga Nacional e Aragonês, respectivamente) e a última antocianina superior nos vinhos vinificados a partir da casta Touriga Nacional (8,6 e 7,9 % de área da malvidina-*p*-cumarilglucósido no vinho da casta Touriga Nacional e Aragonês, respectivamente) (figura 2C).



C

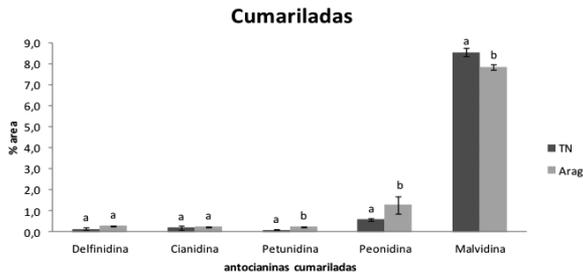


Figura 2 - Perfil das antocianinas monoméricas dos vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional (TN) e Aragonês (Arag). Série monoglucosilada (A), série acetilada (B) e série cumarilada (C).

Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

De forma a melhor elucidar se o perfil das antocianinas discrimina os vinhos vinificados a partir das duas castas, foi efetuada a análise em componentes principais utilizando os dados das séries das antocianinas monoglucosiladas, acetiladas e cumariladas (figura 3), verificando-se que a primeira e a segunda componente explicam 88,73% da variância total (CP1 - 55,66 % e CP2 - 33,07 %). Os resultados apontaram para a existência de uma diferenciação dos vinhos em função da casta, localizando-se os vinhos vinificados a partir da casta Aragonês no 1º e 4º quadrante enquanto que os vinhos vinificados a partir da casta Touriga Nacional se localizam no 2º e 3º quadrante.

Na figura 3, a primeira componente (CP 1 - 55,66%) está relacionada positivamente com a série das antocianinas monoglucosiladas e negativamente com a série das antocianinas acetiladas e a segunda componente (CP 2 - 33,07%) está negativamente relacionada com a série das antocianinas cumariladas.

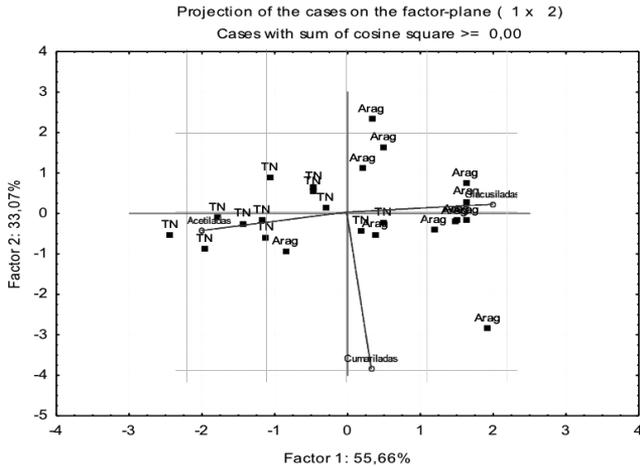


Figura 3 - Projeção dos vinhos das castas Touriga Nacional (TN) e Aragonês (Arag) e da série das antocianinas monoglicosiladas, acetiladas e cumariladas no plano definido pelas duas componentes principais.

Os vinhos colocados à direita (maioritariamente vinhos vinificados a partir da casta Touriga Nacional) caracterizaram-se por apresentarem uma maior percentagem de área de antocianinas acetiladas, enquanto que os vinhos colocados à esquerda (maioritariamente vinhos vinificados a partir da casta Aragonês) caracterizaram-se por apresentarem uma maior percentagem de área de antocianinas monoglicosiladas (figura 3).

Foi ainda efetuada a análise linear discriminante com o intuito de perceber melhor a discriminação dos vinhos em função do seu perfil de antocianinas. Verificou-se que os vinhos monovarietais da casta Aragonês e Touriga Nacional estão praticamente discriminados (94%) (figura 4). Das 21 amostras de vinhos da casta Aragonês analisadas, 2 foram classificadas como Touriga Nacional e das 32 amostras de vinhos Touriga Nacional analisadas, apenas uma foi classificada como Aragonês, o que mostra o potencial do perfil das antocianinas para discriminar os vinhos monovarietais quanto à casta.

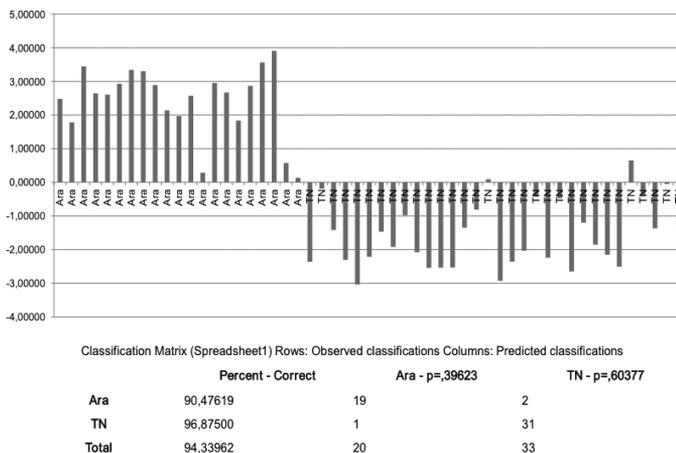


Figura 4 - Análise linear discriminante dos vinhos monovarietais da casta Touriga Nacional (TN) e da casta Aragonês (Ara) tendo como base o perfil de antocianinas.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que de um modo geral, os vinhos monovarietais da casta Aragonês apresentam uma maior percentagem de antocianinas monoglucosiladas (78,1 %) em relação aos vinhos monovarietais da casta Touriga Nacional (71,5 %). No entanto, os vinhos monovarietais da casta Touriga Nacional apresentaram uma maior percentagem de antocianinas acetiladas (18,3 %) quando comparados com os vinhos monovarietais da casta Aragonês (12,5 %). Já as antocianinas cumariladas apresentaram percentagens idênticas nos dois vinhos (9,9 % para os vinhos monovarietais da casta Aragonês e 9,5 % para os vinhos monovarietais da casta Touriga Nacional). As diferenças no perfil de antocianinas dos vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional e Aragonês permite praticamente discrimina-los, como se pode constatar pelos resultados obtidos na análise em componentes principais (88,73 %) e pela análise linear discriminante (94 %).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AROZARENA I., CASPA., MARIN R., NAVARRO M. (2000a). Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 108-112.
- AROZARENA I., CASP A., MARIN R., NAVARRO M. (2000b). Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, 80: 1909-1917.
- BAER D., RENTZSCH M., HITSCHFELD M., MARDONESA C., VERGARA C., WINTERHALTER P. (2008). Relevance of chromatographic efficiency in varietal authenticity verification of red wines based on their anthocyanin profiles: Interference of pyranoanthocyanins formed during wine ageing. *Analytica chimica acta*, 621: 52–56.
- BURNS I., MULLEN W., LANDRAULT N., TEISSEDRE P.L., LEAN M.E.I., CROZIER A. (2002). Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4096-4102.
- CALÓ A., Tomasi D., Cravero M.C., Di Stefano R. (1994). Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoi tartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti*. 1054: 47-61
- CAVERO M. C, DI STEFANO R. (1990). I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. *Riv. Vitic. Enol.*, 1: 33-44
- OIV (Office International de la Vigne et du Vin). (2003). Resolution OENO 22/2003, Paris.
- OTTENEDER H., MARX R., OLSCHIMKE D. (2001). Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. *O.I.V. F.V.N°* 1130.
- OTTENEDER H., HOLBACH B., MARX R., ZIMMER M. (2002). Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanenspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, 52: 187-194.
- REVILLA E., GARCIA-BENEYTEZ 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.
- SCHWARZ C. M., HOFMANN G., WINTERHALTER P. (2004). Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. pinotage: factors influencing the formation of pinotin A and its correlation with wine age. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 498-504.
- ZHAO Q., DUAN C., WANG J. (2010). Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 2212-2228.
- WIRTH J., MOREL-SALMI C., SOUQUET J. M., DIEVAL J. B., AAGAARD O., VIDAL S., FULCRAND H., CHEYNIER V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.

ESTABILIZAÇÃO PROTEICA DE VINHOS BRANCOS POR ADIÇÃO DE MANOPROTEÍNAS E IMPACTO NA QUALIDADE

Tânia RIBEIRO¹; Conceição FERNANDES¹; Fernando M. NUNES ²; Luís FILIPE-RIBEIRO³; Fernanda COSME³

RESUMO

As proteínas, embora em reduzida concentração no vinho branco, podem ser fatores de instabilidade, e podem afetar a limpidez e/ou originar depósitos amorfos. Para prevenir a instabilidade proteica é tradicionalmente efetuada a colagem dos vinhos brancos com bentonite. Contudo, esta cola inorgânica apresenta algumas limitações, particularmente quando aplicada em doses elevadas. Neste contexto, foram avaliadas várias manoproteínas comerciais para a estabilização proteica dos vinhos, como possíveis alternativas à bentonite. Para o efeito caracterizaram-se onze manoproteínas, quanto à sua composição proteica e em açúcares. A sua eficácia foi avaliada relativamente ao seu potencial de estabilização proteica, bem como ao seu efeito no potencial de acastanhamento, composição fenólica e nas características sensoriais do vinho.

Palavras-chave: vinho branco; estabilidade proteica; manoproteínas; bentonite; composição fenólica, características sensoriais.

1 - INTRODUÇÃO

No vinho branco a instabilidade proteica é considerada um defeito que pode conduzir à rejeição do produto (RIBÉREAU-GAYNON *et al.* 2006; SAUVAGE *et al.* 2010). A desnaturação e conseqüente precipitação das proteínas instáveis presentes no vinho, podem originar turvação ou formação de depósitos amorfos após o engarrafamento (WATERS *et al.* 2005). A concentração de proteínas, assim como a composição das fracções proteicas, dependem da casta, condições climáticas, estado de maturação das uvas e pro-

¹ Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária (CIMO-ESAB) Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. email: conceicao.fernandes@ipb.pt

² Centro de Química de Vila Real (CQ-UTAD) Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fnues@utad.pt

³ Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Genómica e Biotecnologia, (IBB/CGB-UTAD) Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Edifício de Enologia, 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fcosme@utad.pt; fmota@utad.pt

cesso de vinificação (PASHOVA *et al.* 2004; SAUVAGE *et al.* 2010). A colagem com bentonite é o processo mais comum na remoção de proteínas do vinho, porém a sua eficiência depende do tipo de bentonite, dose adicionada, composição do vinho em proteínas, temperatura e pH (RIBÉREAU-GAYNON *et al.* 2006). Pelo facto de a bentonite não apresentar especificidade para as proteínas instáveis do vinho (LAMBRI *et al.* 2010), a sua utilização pode conduzir a consequências indesejáveis, como remoção de moléculas relacionadas com a cor, aroma e sabor, modificando as características sensoriais (HØJ *et al.* 2000). Assim, têm sido estudadas alternativas, como por exemplo a aplicação de manoproteínas (GONZALEZ-RAMOS *et al.* 2008) que quando usadas como estabilizantes, podem prevenir a turvação (GONZALEZ-RAMOS *et al.* 2006) e eventualmente melhorar as características sensoriais do vinho (ESCOT *et al.* 2001).

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes manoproteínas, comparativamente à bentonite, na estabilização proteica e na qualidade final do vinho, nomeadamente na composição fenólica, características cromáticas e sensoriais em vinho branco.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Vinho

Foi usado um vinho branco da região Demarcada do Douro, da colheita de 2011, com as seguintes características físico-químicas: teor alcoólico 14,2 % (v/v); massa volúmica (20°C) 0,9890 g/cm³; acidez total 5,5 g/L (em ácido tartárico); pH 3,29, acidez volátil 0,31 g/L (em ácido acético) e o teste de estabilidade proteica (teste do calor 80 °C, 30 minutos, vinho instável se Δ NTU > 2 NTU), o vinho apresentou-se instável com 7,1 NTU.

2.2 - Ensaio de estabilidade proteica

Foram testadas onze manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA) diferentes quanto ao peso molecular e processo de extração, e uma bentonite (M –cálcica ativada). As 11 manoproteínas, foram aplicadas na dose máxima recomendada pelo fabricante e no caso da bentonite aplicou-se a dose média. As manoproteínas e a bentonite foram preparadas de acordo com as especificações dos fabricantes. Os ensaios de cola-

gem foram conduzidos em 375 mL de vinho à temperatura de 20 °C durante 7 dias. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado.

2.3 - Caracterização das manoproteínas

A análise qualitativa e quantitativa em açúcares foi realizada por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica por pulsos, após hidrólise ácida. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Kjeldahl. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.4 - Métodos analíticos

O teor alcoólico, a massa volúmica, a acidez total, a acidez volátil e o pH foram determinados num FTIR Baccus. A estabilidade proteica foi avaliada pelo teste do calor (RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD 1961). O índice de polifenóis totais (IPT) foi determinado pela medição da absorvância a 280 nm (RIBÉREAU-GAYNON *et al.* 2006). O potencial de acastanhamento foi determinado de acordo com SINGLETON e KRAM-LING (1976). As características cromáticas foram determinadas de acordo com os métodos da OIV (2012). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.5 - Análise sensorial

A análise sensorial dos vinhos foi realizada por um painel de provadores treinados, tendo sido seleccionados quinze atributos: aspecto (limpidez, cor), aroma (intensidade aromática, frutado, floral, vegetal, oxidado, químico) e sabor (doçura, acidez, amargo, intensidade gustativa, volume gustativa, equilíbrio gustativo, persistência). Estes atributos foram quantificados através de uma escala de intensidade de dez pontos (ISO 4121, 2003).

2.6 - Análise estatística

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) aos dados físico-químicos e sensoriais, utilizando o programa Statistica versão 6. As diferenças entre os valores médios foram efetuadas com o teste Tukey ($p < 0,05$) para os dados das análises físico-químicas e com o teste de Duncan ($p < 0,05$) para os dados da análise sensorial.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Efeito da aplicação de manoproteínas na estabilidade proteica de vinhos

A estabilidade proteica dos vinhos aos quais foi adicionado bentonite e diferentes tipos de manoproteínas foi avaliada pelo teste do calor (Quadro 1).

Quadro-1-Teste de estabilidade proteica pelo calor aplicado ao vinho branco e volume de borras, após o tratamento com manoproteínas e bentonite.

	C	Teste do calor		Volume de borra	
		i	0		
Controlo	C				
Bentonite	M	s			++
Manoproteínas	NS	s			-
	VP	s			-
	BM	s			-
	Mb	s			-
	B150	i			-
	BB	s			-
	NF	s			-
	B20	s			-
	PG	i			-
	V	s			-
	BA	s			-

Testes de estabilidade: instável (i), estável (s). Volume de borras: inexistente (0); reduzido (-); médio (+); elevado (++) . Controlo (C), bentonite (M), manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG,V, BA).

Como esperado, a bentonite foi eficaz na remoção das proteínas instáveis do vinho. Também nove das onze manoproteínas testadas se mostraram eficientes na estabilização proteica do vinho. O volume de borras produzido pela aplicação da bentonite foi marcadamente superior ao resultante da aplicação das manoproteínas, o que implica potencialmente uma menor perda de vinho (Quadro 1).

3.2 – Caracterização das manoproteínas

Para compreender a relação entre a composição das manoproteínas e o seu efeito na estabilização proteica, estas foram caracterizadas quanto ao teor em açúcares totais, manose e glucose e proteína total (Figura 1).

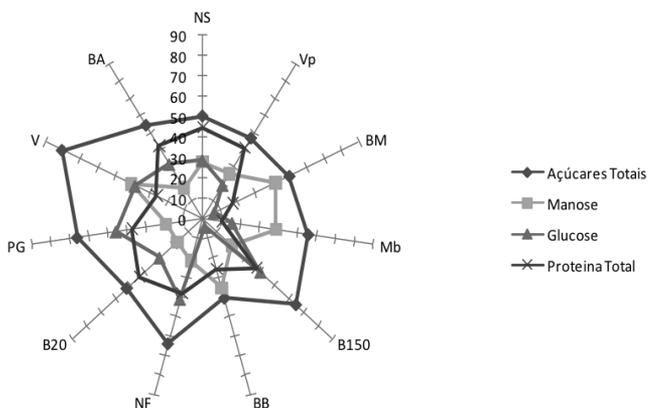


Figura - 1 Composição em açúcares totais, manose, glucose e proteína total (g/100 g) das manoproteínas testadas neste estudo.
Manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA).

Os resultados obtidos sugerem que as manoproteínas mais eficazes na estabilização proteica dos vinhos são as que possuem uma maior concentração em manose e menor concentração de proteína total (Quadro 1).

3.3 – Efeito da aplicação da bentonite e das manoproteínas no índice de polifenóis totais e potencial de acastanhamento do vinho branco

Os resultados indicam que a bentonite testada não induz alterações significativas ($p > 0,05$) no índice de polifenóis totais, porém algumas manoproteínas provocaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) (Figura 2).

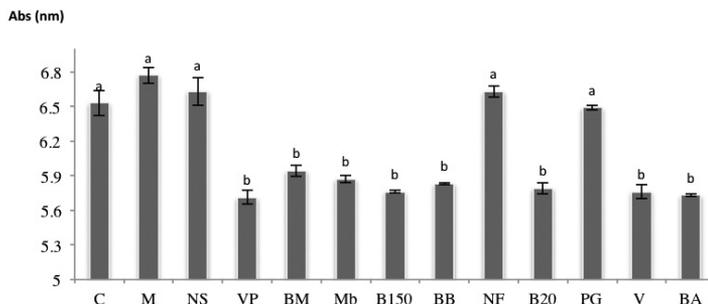


Figura - 2 Índice de polifenóis totais do vinho branco após a aplicação da bentonite e das manoproteínas.

Controlo (C), bentonite (M), manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

Os resultados obtidos para o potencial de acastanhamento mostraram um decréscimo após a aplicação de bentonite; o mesmo se verifica após a aplicação de manoproteínas, principalmente da NF e B20 (Figura 3).

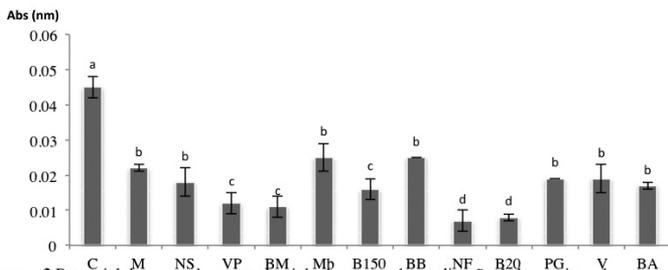


Figura - 3 Potencial de acastanhamento do vinho branco após a aplicação da bentonite e das manoproteínas. Controlo (C), bentonite (M), manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

3.4 – Efeito da aplicação da bentonite e das manoproteínas na variação da cor do vinho branco

Após aplicação do sistema CIELab, foi possível calcular a variação da cor (ΔE^*) dos vinhos tratados relativamente ao vinho sem tratamento. A variação da cor (ΔE^*) é a média geométrica de ΔL^* , Δa^* e Δb^* , esta pode ser visualmente discriminada pelo olho humano quando apresenta valores superiores a 2 unidades CIELab. Comparando os vinhos entre si, é possível verificar que os valores de ΔE^* mais elevados foram obtidos apenas para o vinho tratado com a manoproteína VP (Figura 4).

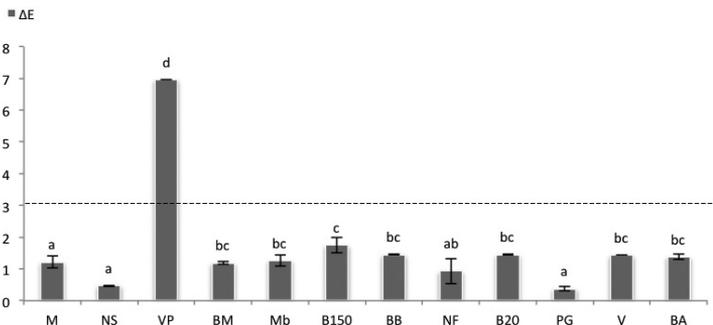


Figura - 2 Variação da cor do vinho branco após aplicação da bentonite e das manoproteínas.

Bentonite (M), manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

3.5 – Avaliação sensorial

Após análise sensorial do vinho submetido a diferentes tratamentos não se verificaram diferenças significativas (Quadro 2), contudo verifica-se uma maior pontuação total atribuída a alguns vinhos onde foram aplicadas manoproteínas.

Quadro-2 – Pontuações atribuídas a cada descritor após a análise sensorial dos vinhos antes e depois do tratamento com bentonite e manoproteínas (média±DP).

Descritores	Bentonite				Manoproteínas								
	C	M	NS	VP	BM	Mb	B150	BB	NF	B20	PG	V	BA
Cor	7±2 ^a	8±2 ^a	8±2 ^a										
Limpidez	7±3 ^a	8±2 ^a	7±3 ^a	7±3 ^a									
Intensidade Aromática	7±2 ^a	6±2 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a	6±1 ^a								
Frutado	7±2 ^a	5±1 ^a	6±2 ^a	6±2 ^a	6±2 ^a	5±2 ^a	6±1 ^a	5±2 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	5±2 ^a	6±1 ^a
Floral	5±2 ^a	4±1 ^a	5±2 ^a	6±2 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	5±1 ^a	5±2 ^a	5±2 ^a				
Vegetal	3±2 ^a	3±3 ^a	3±2 ^a	3±2 ^a	3±2 ^a	2±2 ^a	2±2 ^a	3±2 ^a	2±2 ^a				
Oxidado	2±2 ^a	2±2 ^a	2±1 ^a	2±2 ^a	3±3 ^a	2±2 ^a	3±3 ^a	3±2 ^a	2±2 ^a				
Químico	3±2 ^a	3±3 ^a	2±2 ^a	3±2 ^a	2±2 ^a	2±2 ^a	3±2 ^a	3 ± 2 ^a	2±2 ^a				
Doçura	5±2 ^a	5±2 ^a	5±2 ^a	5±1 ^a	5±2 ^a	5±2 ^a	4±2 ^a	5±2 ^a	5±1 ^a				
Acidez	7±1 ^a	6±2 ^a	7±1 ^a	6±1 ^a	6±2 ^a	6±2 ^a	6±2 ^a	7±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±2 ^a	6±1 ^a	6±2 ^a
Amargo	4±2 ^a	3±1 ^a	3±2 ^a	3±1 ^a	3±2 ^a	4±2 ^a	3±1 ^a						
Intensidade Gustativa	6±2 ^a	6±1 ^a	6± 1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	5±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±2 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a
Volume Gustativo	6±1 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a	7±1 ^a	6±2 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±2 ^a	7±1 ^a
Equilíbrio Gustativo	6±1 ^{bc}	6±1 ^{bc}	6±1 ^{bc}	7±2 ^{bc}	6±1 ^{bc}	7±1 ^{bc}	5±2 ^{bc}	7±1 ^a					
Persistência	6±2 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a	7±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a	6±1 ^a						
Total	81	77	80	80	78	76	76	80	82	79	80	79	79

Controlo (C), bentonite (M), manoproteínas (NS, VP, BM, Mb, B150, BB, NF, B20, PG, V, BA). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o descritor avaliado (teste de Duncan).

4 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a eficácia da bentonite na estabilidade proteica dos vinhos. Por outro lado, as manoproteínas também demonstraram uma influência positiva na estabilização proteica do vinho. Ao nível sensorial não se verificaram diferenças significativas ($p < 0.05$), à excepção do descritor equilíbrio gustativo, onde os vinhos estabilizados com as manoproteínas foram mais pontuados quanto aos descritores frutado e floral. As manoproteínas parecem poder ser uma alternativa eficaz ou um complemento ao método tradicional (colagem com bentonite), porem, convém salientar que estes resultados devem ser encarados como preliminares, sendo necessário realizar mais estudos com outros tipos de vinhos.

5 - AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Unidade de Microbiologia e Biotecnologia do Vinho IBB/CGB-UTAD. Agradecimentos adicionais para a SAI, AEB Bioquímica Portuguesa, S. A e Enartis pelo fornecimento de agentes de colagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESCOT S., FEULLIAT M., DULAU L., CHARPENTIER C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 153–159.
- GONZALEZ-RAMOS D., CEBOLLERO E., GONZALEZ R. (2008). A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against proteins haze. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5533-5540.
- GONZALEZ-RAMOS D., GONZALEZ R. (2006). Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9411-9416.
- HØJ P.B., TATTERSALL D.B., ADAMS K., POCOCK K.F., HAYASAKA Y., VAN HEESWIJCK R., WATERS E. (2000) The 'haze proteins' of wine – a summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine. Proceedings of *ASEV 50th Anniversary Meeting*, Seattle, Washington, USA. *American Society of Enology and Viticulture*: Davis, California pp. 149–154.
- ISO 4121, 2003, Retrieved November 20, 2008 from <http://www.iso.org/iso/catalogue>.
- LAMBRI M., DORDONI R., SILVA A., FAVERI D.M. (2010). Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 225-233.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). (2012). *Récueil de Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts*. Edition Officielle. Paris.
- PASHOVA V., GUELL C., LÓPEZ F. (2004). White wine continuous protein stabilization by Packed Column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1558-1563.
- RIBÉREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A., DUBOURDIEU D. (2006). *Handbook of Enology. Volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 1-426.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. (1961). *Traité d'oenologie*. Vol II. Berauges, Paris.
- SAUVAGE F.X., BACH B., MOUTONET M., VERNHET A. (2010). Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118, 26-34.
- SINGLETON V.L., KRAMLING T.E. (1976). Browning of white wines and accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 157–160.
- WATERS E.J., ALEXANDER G., MUHLACK R., POCOCK K. F., COLBY C., O'NEILL B.K., HØJ P.B., JONES, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 215–225.

DESOXIGENAÇÃO APÓS TRANSPORTE: IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUIMÍCAS E SENSORIAIS DO VINHO LOUREIRO

Susete RODRIGUES^{1,2,3}, Luís FILIPE-RIBEIRO², Fernando M. NUNES³,
Fernanda COSME²

RESUMO

A gestão do oxigénio representa um grande desafio em enologia, uma vez que a excessiva exposição ou protecção poderá provocar defeitos sensoriais. Na produção de vinho branco, é normalmente evitado o contacto excessivo com o oxigénio, uma vez que, poderá afectar o aroma, cor e, eventualmente, reduzir o tempo de prateleira (*shelf-life*). A monitorização e o controlo dos níveis de oxigénio nas diferentes etapas de produção são de extrema importância. O transporte de vinho a granel é uma das etapas na qual o oxigénio pode entrar em contacto com o vinho de forma descontrolada, pelo que o principal objectivo deste trabalho foi verificar o efeito do transporte e do processo de desoxigenação na qualidade do vinho Loureiro. O vinho foi monitorizado em três etapas fundamentais: antes e após o transporte do vinho a granel, e após o processo de desoxigenação. Em cada etapa foi analisado o impacto sobre a composição fenólica, características cromáticas e sensoriais. Os resultados obtidos demonstram o impacto negativo do transporte na qualidade do vinho, no entanto, também demonstra que o processo de desoxigenação pode ser uma mais-valia técnica para minimizar o efeito negativo da excessiva exposição do vinho ao oxigénio.

Palavras-chave: vinho Loureiro, oxigénio, desoxigenação, compostos fenólicos, impacto sensorial.

1 - INTRODUÇÃO

A evolução do vinho está extremamente dependente da quantidade de oxigénio dissolvido (GODDEN *et al.* 2005), por este ser essencial ao seu desenvolvimento influenciando a sua cor, aroma e sabor (LEMAIRE 1995). No entanto, quando o oxigénio está

¹ Caves do Monte – Vinhos SA, Sousela – Lousada, email: susete@cavesdomonte.com

² Instituto de Biotecnologia e de Bioengenharia – Centro de Genómica e Biotecnologia, (IBB-CGB-UTAD), UTAD, Edifício de Enologia 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fcosme@utad.pt, fmota@utad.pt

³ Centro de Química de Vila Real (CQ-UTAD), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fnunes@utad.pt.

presente em certas etapas da produção ou em níveis elevados, pode provocar efeitos negativos, tais como a estimulação do crescimento de microrganismos indesejáveis e alterações importantes na cor e no aroma do vinho (CAILLÉ *et al.* 2010).

O termo oxigenação refere-se normalmente à exposição controlada de um vinho ao oxigénio e implica geralmente um impacto positivo na sua qualidade. Em contraste, o termo oxidação (ou oxidado) é frequentemente associado às consequências negativas da exposição excessiva ao oxigénio (BLACKBURN 2004). A degradação oxidativa é principalmente devida à reação promovida pelo oxigénio em si, o que é bastante diferente do que acontece durante o envelhecimento, em que as alterações na composição são devidas a vários tipos de reações.

A degradação oxidativa do vinho depende de vários fatores, tais como a composição do vinho, a concentração de oxigénio dissolvido, o pH, a temperatura de armazenamento, a concentração e o tipo de compostos fenólicos, bem como a presença de antioxidantes exógenos, como o dióxido de enxofre e o ácido ascórbico (WILDENRADT e SINGLETON 1974; SINGLETON e KRAMLING 1976; VIVAS *et al.* 1993).

A oxidação dos vinhos brancos leva a uma perda dos seus atributos sensoriais, nomeadamente das características aromáticas dos vinhos jovens, ou seja, dos aromas florais e frutados (SINGLETON e KRAMLING 1976; ESCUDERO *et al.* 2000), e a cor evolui para uma tonalidade acastanhada (acastanhamento não enzimático) (LEMAIRE 1995). A degradação aromática ocorre antes da alteração cromática.

A introdução do oxigénio pode ocorrer durante as operações de transferência, na filtração e antes do engarrafamento (GODDEN *et al.* 2005). Assim, a monitorização do oxigénio no vinho é importante para maximizar a sua qualidade, dado que a sua presença em excesso resultará numa possível oxidação, diminuindo a sua qualidade e consequentemente o seu tempo de vida útil (*shelf-life*).

O tempo de vida útil de um vinho é uma preocupação primordial em enologia por estar diretamente relacionada com a sua resistência à oxidação. Na verdade, o vinho contém um grande número de antioxidantes naturais pertencentes a diferentes famílias de compostos fenólicos (ESCUDERO *et al.* 2002), por outro lado contem um elevado número de constituintes que podem ser facilmente oxidados, tais como, iões ferro, ácido ascórbico, compostos fenólicos e etanol (BOULTON *et al.* 1996).

O transporte de vinho a granel é uma etapa crítica, na qual o oxigénio pode entrar em contacto com o vinho de forma descontrolada. São transportados diariamente milhares de litros de vinhos a granel, pelo que a remoção eficaz do oxigénio em excesso em tempo útil, poderá melhorar a qualidade e/ou minimizar possíveis oxidações resultantes do transporte do vinho. Assim, o objetivo deste trabalho foi efectuar a monitorização das concentrações de oxigénio dissolvido presentes no vinho Loureiro antes e depois do transporte e após desoxigenação; bem como o acompanhamento dos vinhos durante um período de nove meses, avaliando também a sua evolução físico-química, fenólica e sensorial.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Vinho

Foi utilizado um vinho Loureiro, colheita 2010 (teor alcoólico 9,0 % (v/v); acidez total 10,3 g/L e pH 2,91). As amostras foram codificadas com a **Etapa**: 0 – antes do transporte, 1 – depois do transporte, 2 – desoxigenação e o **Tempo**: T0 (tempo inicial), T1 (primeiro mês), T3 (terceiro mês), T6 (sexto mês) e T9 (nono mês).

2.2 - Delineamento experimental

As amostras foram recolhidas em triplicado nas três etapas (figura 1). O acompanhamento da evolução dos parâmetros físico-químicos foi realizado no tempo T0, T1, T3, T6 e T9 e a análise sensorial foi realizada no tempo T0, T3 e T9.

O processo de desoxigenação consistiu no varrimento do vinho com azoto (pureza > 99,5 %) com um difusor durante a receção do vinho, na quantidade de 10 % do caudal da bomba.

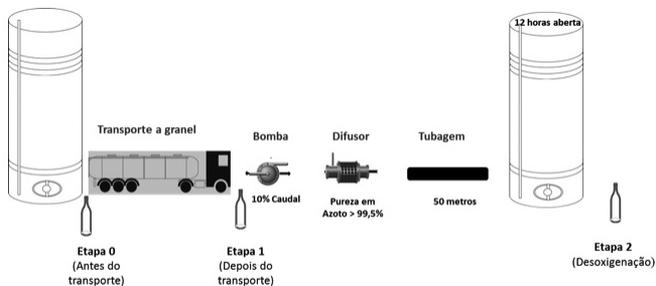


Figura 1 – Esquema representativo do delineamento experimental.

As amostras foram recolhidas em garrafas de vidro (bordalesa prestígio, cor canela) com 750 mL de capacidade, espaço de cabeça à volta dos 6 mm, sulfuroso livre do vinho corrigido para 40 mg/L. As garrafas foram fechadas com rolha técnica (Twin Top) devido à baixa taxa de difusão de oxigénio (LOPES *et al.* 2006) durante o tempo total do estudo, 9 meses. As amostras foram colocadas 12 horas na posição vertical e posteriormente foram armazenadas na posição horizontal a 20 °C.

2.3 - Métodos analíticos e tratamento estatístico

As metodologias analíticas utilizadas para a análise físico-química do vinho encontram-se descritas no quadro 1.

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos utilizou-se o programa STATISTICA (versão 6) tendo sido utilizada a análise de variância (ANOVA) para detectar diferenças entre as variáveis. A diferença entre os valores médios dos dados das análises físico-químicas foi feita pelo teste de Tukey (HSD 5%) e nos dados da análise sensorial aplicou-se o teste de Duncan (5%).

Quadro 1 – Parâmetros analíticos e metodologias utilizadas para a análise físico-química do vinho.

Parâmetro	Referência do método
Análise sumária	OIV (2012)
Oxigénio dissolvido	OXI 45P Crison
Acetaldeído	Kit enzimático
Índice de gelatina	GLORIES (1984)
Índice de polifenóis totais	RIBEREAU-GAYON <i>et al.</i> (2006)
Capacidade de acastanhamento	SINGLETON e KRAMLING (1976)
Análise sensorial	ISO 4121, 2003

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Efeito do transporte e desoxigenação nas características físico-químicas

A acidez volátil aumentou durante os nove meses de estudo (figura 2). No vinho antes do transporte, etapa 0, houve um aumento de 0,28 g/L para 0,39 g/L. O vinho desoxigenado foi o que apresentou um menor aumento deste parâmetro, havendo diferenças significativas no nono mês.

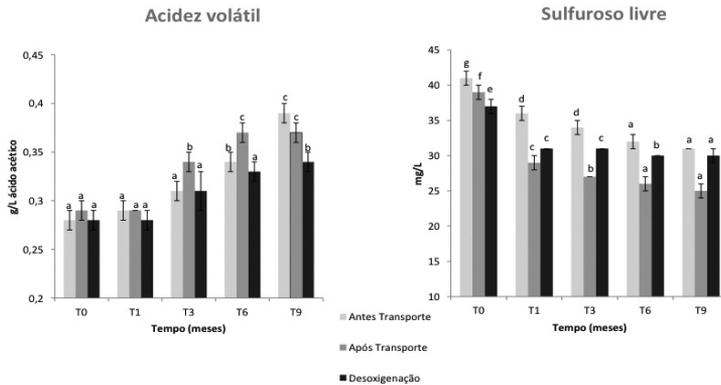


Figura 2 - Evolução dos teores da acidez volátil e do sulfuroso livre ao longo dos nove meses. Tempo: T0 (tempo inicial), T1 (primeiro mês), T3 (terceiro mês), T6 (sexto mês) e T9 (nono mês). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

Nas amostras correspondentes à etapa 1 (após transporte) os níveis de sulfuroso livre diminuíram significativamente e ao mesmo tempo aumentaram os níveis de oxigénio dissolvido (figura 2). Estes resultados estão de acordo com JACOBS (1976) que relacionou a diminuição dos níveis de sulfuroso livre com a presença de oxigénio dissolvido.

3.2 - Efeito do transporte e desoxigenação no oxigénio dissolvido e acetaldéido

Os valores de oxigénio dissolvido aumentaram 2,71 mg/L durante o transporte (figura 3). O processo de desoxigenação baixou o oxigénio dissolvido para valores perto de zero (0,09 mg/L). Nestas condições experimentais o transporte aumentou sempre os níveis de oxigénio dissolvido, o que vai de encontro a estudos anteriores realizados por VIDAL *et al.* (2001).

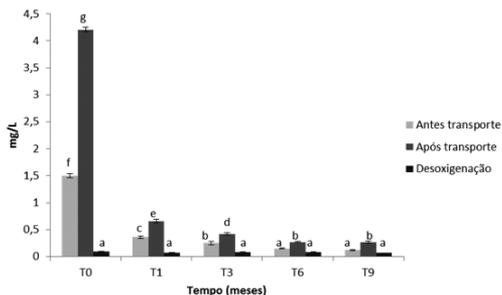


Figura 3 - Evolução dos teores do oxigênio dissolvido ao longo dos nove meses. Tempo: T0 (tempo inicial), T1 (primeiro mês), T3 (terceiro mês), T6 (sexto mês) e T9 (nono mês). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

O teor de acetaldeído não apresentou alterações significativas durante os nove meses do estudo nas três etapas, idênticos resultados foram obtidos por ESCUDERO *et al.* (2002).

3.3 - Efeito do transporte e desoxigenação no índice de polifenóis totais

O índice de polifenóis totais (IPT) diminuiu significativamente ao longo dos nove meses nas três etapas (0, 1 e 2) (figura 4).

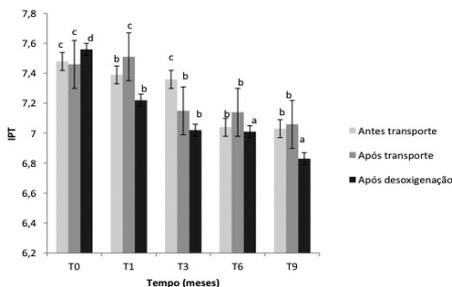


Figura 4 - Evolução do índice de polifenóis totais ao longo dos nove meses. Tempo: T0 (tempo inicial), T1 (primeiro mês), T3 (terceiro mês), T6 (sexto mês) e T9 (nono mês). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

A maior diminuição foi observada no vinho desoxigenado. A diminuição dos compostos fenólicos ao longo do tempo de armazenamento está em acordo com estudos anteriores (DE BEER *et al.* 2008).

3.4 - Efeito do transporte e desoxigenação na cor e nas características cromáticas

A cor a 420nm aumenta ao longo dos nove meses de armazenamento (figura 5), o que está de acordo com SINGLETON e KRAMLING (1976). Após o terceiro mês foram detetadas diferenças significativas ($p < 0,05$) neste parâmetro com exceção do vinho desoxigenado, o qual teve diferenças significativas só após o sexto mês. O vinho desoxigenado (etapa 2), independentemente do tempo (3, 6 ou 9 meses), foi o que apresentou uma menor evolução na cor. Em contraste o vinho após transporte (etapa 1) foi o que apresentou uma maior evolução. Os resultados indicam que a desoxigenação poderá atrasar a evolução da cor e que o transporte aumentará a sua evolução, o que não é desejável em vinhos brancos.

O potencial de acastanhamento do vinho Loureiro antes e após transporte (etapa 0 e 1), aumentou significativamente logo após o terceiro mês (figura 5), enquanto o vinho desoxigenado se mostrou relativamente estável neste parâmetro.

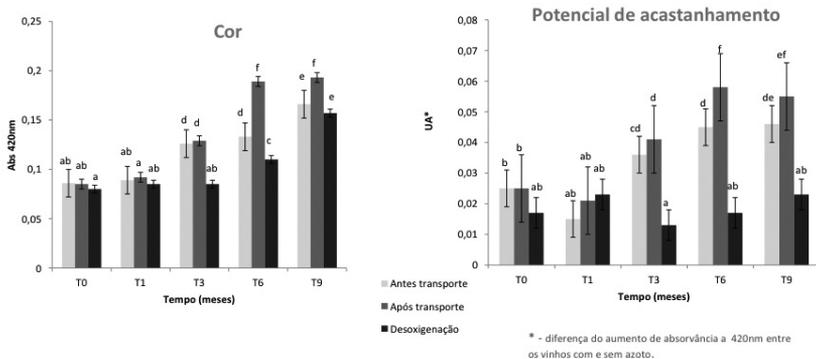


Figura 5 - Evolução da cor e do potencial de acastanhamento ao longo dos nove meses. Tempo: T0 (tempo inicial), T1 (primeiro mês), T3 (terceiro mês), T6 (sexto mês) e T9 (nono mês). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

3.5 - Efeito do transporte e desoxigenação nas características sensoriais

Foram verificadas diferenças significativas no descritor herbáceo, frutado e amargo. No primeiro mês a maior pontuação foi atribuída ao descritor frutado no vinho antes do transporte e no nono mês para o vinho desoxigenado (quadro 2).

Quadro 2 - Pontuação média atribuída a cada descritor após análise sensorial dos vinhos.

	Tempo inicial			Terceiro mês			Nono mês			
	T0L0	T0L1	T0L2	T3L0	T3L1	T3L2	T9L0	T9L2		
Visual	Intensidade corante	2.84 ^a	3.00 ^a	2.84 ^a	3.34 ^a	3.50 ^a	3.18 ^a	3.83 ^a	4.00 ^a	4.00 ^a
	Tonalidade corante	2.84 ^a	3.00 ^a	2.84 ^a	3.67 ^a	3.50 ^a	4.17 ^a	4.00 ^a	4.17 ^a	4.00 ^a
	Limpidez	6.33 ^a	5.66 ^{ab}	4.50 ^a	6.30 ^b	7.50 ^b	7.66 ^b	7.50 ^b	7.50 ^b	7.67 ^b
Aroma	Oxidado	1.50 ^a	1.50 ^a	1.50 ^a	3.33 ^a	3.00 ^a	3.16 ^a	3.33 ^a	3.00 ^a	3.00 ^a
	Frutado	6.16 ^b	5.33 ^{ab}	5.00 ^{ab}	5.67 ^{ab}	4.33 ^a	6.33 ^b	5.67 ^{ab}	5.50 ^{ab}	6.17 ^b
	Floral	5.33 ^a	4.33 ^a	4.00 ^a	5.00 ^a	5.33 ^a	4.00 ^a	6.00 ^a	5.50 ^a	4.83 ^a
	Herbáceo	4.50 ^{ab}	4.00 ^{ab}	2.67 ^a	4.17 ^{ab}	4.33 ^{ab}	4.67 ^{ab}	4.17 ^{ab}	5.17 ^b	4.33 ^{ab}
	Especiarias	2.33 ^a	2.50 ^a	2.17 ^a	2.83 ^a	3.16 ^a	3.16 ^a	3.67 ^a	3.67 ^a	3.50 ^a
	Acetaldeído	3.33 ^a	3.67 ^a	2.83 ^a	4.00 ^a	3.33 ^a	4.50 ^a	3.17 ^a	5.33 ^a	4.17 ^a
	Amargo	6.33 ^b	6.50 ^b	7.50 ^b	4.50 ^b	4.50 ^b	4.00 ^b	4.50 ^{ab}	4.00 ^{ab}	4.00 ^a
Sabor	Acidez	7.33 ^a	7.67 ^a	6.83 ^a	7.33 ^a	7.33 ^a	7.50 ^a	7.67 ^a	7.67 ^a	7.83 ^a
	Doçura	3.00 ^a	2.83 ^a	2.83 ^a	2.33 ^a	2.50 ^a	2.50 ^a	2.33 ^a	2.00 ^a	2.16 ^a
	Corpo	4.00 ^a	4.17 ^a	4.33 ^a	4.50 ^a	5.00 ^a	4.83 ^a	3.67 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a
	Equilíbrio	3.50 ^a	3.00 ^a	3.50 ^a	3.83 ^a	4.00 ^a	3.67 ^a	3.67 ^a	3.17 ^a	3.67 ^a
	Persistência	5.17 ^a	5.33 ^a	5.00 ^a	5.17 ^a	5.50 ^a	5.17 ^a	5.50 ^a	5.33 ^a	5.33 ^a

T0 (tempo inicial), T3 (terceiro mês), T9 (nono mês). **Etapa:** 0 – antes transporte, 1 – após transporte, 2 - desoxigenação. Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o descritor avaliado (teste de Duncan).

O vinho que foi sujeito ao processo de transporte aumentou ao longo dos nove meses o caráter herbáceo. Também, ESCUDERO *et al.* (2002) identificaram um aumento do aroma herbáceo na presença de oxigénio. O descritor amargo teve uma pontuação mais baixa, após três meses. O descritor de aroma a acetaldeído não se alterou significativamente ao longo dos nove meses de estudo, estes resultados estão em conformidade com os valores de acetaldeído obtidos analiticamente e em linha com os trabalhos de ESCUDERO *et al.* (2002).

4 - CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que os níveis de oxigénio aumentam significativamente durante o transporte a granel (mais do que 2 mg/L), provocando simultaneamente, uma diminuição significativa dos níveis de sulfuroso livre e uma subida da acidez volátil ao longo do tempo. O processo de desoxigenação pode diminuir os valores de oxigénio dissolvido de 4 mg/L para valores próximos de 0 mg/L. A evolução da cor foi mais lenta nas amostras desoxigenadas. Na análise sensorial o vinho desoxigenado foi o mais pontuado no descritor frutado (no terceiro e nono mês).

Este trabalho mostrou claramente, que o transporte tem um impacto negativo na qualidade do vinho branco em vários aspectos. No entanto, a desoxigenação permite manter níveis de sulfuroso livre e acidez volátil mais estáveis ao longo do tempo, preservando simultaneamente a cor e o carácter frutado do vinho. Assim, a desoxigenação poderá ser uma técnica vantajosa e conducente à manutenção ou melhoria da qualidade. Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para a indústria vitivinícola, tendo em conta que o nível de oxigénio dissolvido no vinho e o seu controlo são um factor de qualidade absolutamente incontornável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACKBURN D. (2004). Micro-oxygenation. Lessons from a decade of experience. *Practical Winery and Vineyard*, 2, 32-39.
- BOULTON R. B., SINGLETON V. L., BISSON L. F., KUNKEE R. E. (1996). Principles and Practices of Winemaking. Chapman and Hall.
- CAILLÉ S., SAMSON A., WIRTH J., DIEVAL J., VIDAL S., CHEYNIER V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pré and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 310, 35-36.
- DE BEER D., JOUBERT J., MANLEY M. (2008). Effect of oxygenation during maturation on phenolic composition, total antioxidant capacity, colour and sensory quality of pinotage wine. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*, 29, 13-25.
- ESCUADERO A., HERNANDEZ-ORTE P., CACHO J. E., FERREIRA V. (2000). Clues about the role of methional as a character impact odorant of some oxidized wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4268-4272.
- ESCUADERO A., ASENIO E., CACHO J., FERREIRA V. (2002). Sensory and chemical changes of young wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some others important odorants. *Food Chemistry*, 77, 325-331.
- GLORIES Y. (1984). La couleur des vins rouges, 2eme Partier. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253-271.
- GODDEN P., LATTEY K., FRANCIS L., GISHEN M., COWEY G., HOLDSTOCK M., ROBINSON E., WATERS E., SKOUROUMOUNIS G., SEFTON M., CAPONE D., KWIATKOWSKI M., FIELD J., COULTER A., D’COSTA N., BRAMLEY B. (2005). Towards offering wine to the consumer in optimal condition; the wine, the closures and other packaging variables. A review of AWRI research examining the changes that occur in wine after bottling. *Wine Industrie Jornal*, 20, 20-30.
- ISO 4121:2003. Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales. Retirado de: <http://www.iso.org/iso/search.htmqt>
- JACOBS D. (1976). Effect of dissolved oxygen on free sulphur dioxide in red wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 1-7.
- LEMAIRE T. (1995). La micro-oxygenation des vins. Thesis École National Supérieure Agronomique, Montpellier, France.
- LOPES P., SAUCIER C., TEISSEDDRE P., Glories Y. (2006). Impact of storage position on oxygen ingress trough different closures in to wines bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6741-6746.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin). (2012). Récueil de Méthodes Internationales d’Analyse des Vins et des Moûts. Edition Officielle. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A., DUBOURDIEU D. (2006). Handbook of

Enology Vol. 1 and 2, *John Wiley & Sons, Ltd.*

- SINGLETON V. L., KRAMLING T. E. (1976). Browning of white wines and accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 157-160.
- VIDAL J. C., DUFOURQ T., MOUTOUNET M. (2001). Les apports d'oxygène au cours des traitements des vins. *Revue Française d'Oenologie*, 190.
- VIVAS N., ZAMORA F., GLORIES Y. (1993). Incidence de certains facteurs sur la consommation de l'oxygène et sur le potencial d'oxydoreduction dans les vins. *Journal International de la Vigne et du Vin*, 27, 23-34.
- WILDENRADT H.L.E., SINGLETON V.L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation in wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 119-126.

UTILIZAÇÃO DA CARBOXIMETILCELULOSE PARA A ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA DE VINHOS BRANCOS

Raquel GUISE^{1,2}; Luís FILIPE-RIBEIRO¹; Diana NASCIMENTO¹; Olga BESSA^{1,2}; Fernando M. NUNES¹; Fernanda COSME²

RESUMO

Os cristais de tartarato formam-se naturalmente no vinho e são uma das principais instabilidades no vinho engarrafado. A utilização de carboximetilcelulose (CMC) tem por objectivo a estabilização tartárica, estando autorizado para vinhos até 100 mg/L (Regulamento (CE) No. 606/2009). O CMC utilizado em enologia é caracterizado, principalmente, pelo seu grau de eterificação, conhecido como grau de substituição (GS) (número de grupos ácido carboxílico por unidade de anidro-glucose), e pelo seu grau de polimerização (GP) (número de unidades de glucose por polímero). O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de quatro CMC's (três na forma líquida e um na forma sólida) em duas concentrações (5 e 10 g/hL) sobre a estabilidade tartárica de dois vinhos brancos bem como a sua influência no teor de ácido tartárico, composição mineral e características sensoriais. Através do teste de mini-contacto verificou-se que os diferentes CMC's baixaram a condutividade a níveis que garantiram a estabilidade tartárica do vinho, havendo uma relação positiva entre a diminuição da condutividade e a quantidade aplicada. Os resultados fornecem informações importantes para a indústria vitivinícola, permitindo conhecer melhor esta nova ferramenta e otimizar a sua aplicação na estabilização tartárica dos vinhos.

Palavras-chave: vinho branco, CMC, condutividade, ácido tartárico, impacto sensorial, estabilidade tartárica.

1 - INTRODUÇÃO

O ácido tartárico é um ácido orgânico característico das uvas e presente no mosto em concentrações de 2 a 6 g/L (KLIEWER *et al.* 1967; SANTOS *et al.* 2000), variando o seu teor em função da região, da casta, do tipo de solo, das práticas culturais e enológicas. O ácido tartárico no vinho pode aparecer sobre três formas: H₂T (ácido tartárico), HT

¹ Centro de Química de Vila Real (CQ-UTAD), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fnunes@utad.pt.

² Instituto de Biotecnologia e de Bioengenharia – Centro de Genómica e Biotecnologia, (IBB-CGB-UTAD), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Edifício de Enologia, 5001-801 Vila Real, Portugal. email: fcosme@utad.pt, fmota@utad.pt.

(ião bitartarato) ou T^{2-} (ião tartarato), devido ao equilíbrio ácido-base, podendo precipitar no vinho sobre a forma de dois sais, hidrogenotartarato de potássio (KHT) pouco solúvel ($K_{sp} 3,8 \times 10^{-4}$ a 18 °C) e/ou tartarato neutro de cálcio (TCa) insolúvel ($K_{sp} 7,7 \times 10^{-7}$ a 25 °C) (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2006). A solubilidade do hidrogenotartarato de potássio depende do teor alcoólico, força iónica, pH e temperatura do vinho. Em função do pH do vinho, as formas de ácido tartárico variam quantitativamente, sendo que ao pH do vinho (pH 3,0 - 3,6) prevalece o bitartarato de potássio. Este dá origem à formação de um precipitado cristalino nos depósitos de armazenamento, e mais grave em garrafas de vinho acabado (CARDOSO 2007). Este depósito é inócuo à saúde do consumidor, prejudicando apenas a apresentação dos vinhos (SANTOS *et al.* 2000; RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2006), sendo provavelmente o tipo de instabilidade mais frequente e que afecta todo o tipo de vinhos (CANTARELLI 1963).

Existem várias técnicas para estabilizar o vinho do ponto de vista tartárico, nomeadamente: arrefecimento do vinho, resinas de troca iónica, electrodiálise, aplicação de ácido metatartárico e mais recentemente a aplicação de carboximetilcelulose (CMC).

O CMC é um aditivo alimentar identificado com o código E466, usado há vários anos (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 2006) como agente modificador de viscosidade e estabilizador de emulsões (BOWYER *et al.* 2010). A partir de 2008, a Organização Internacional de la Vigne et du Vin (OIV) autorizou a utilização do CMC, inicialmente apenas nos vinhos brancos e espumantes (Resolução OENO 2/2008). Recentemente, o Regulamento (CE) N.º 606/2009 aprovou a adição de CMC a todos os tipos de vinhos até 100 mg/L. A carboximetilcelulose de sódio é um hidrocolóide macromolecular obtido por eterificação dos grupos hidroxilo das unidades de glucose (CRACHEREAU *et al.* 2001) da celulose com ácido monocloroacético na presença de hidróxido de sódio (OIV 2012). As principais características estruturais do CMC são o seu grau de substituição (número de grupos carboxilo por unidade anidro-glucose) e o seu grau de polimerização (comprimento da cadeia, ou seja, número de moléculas de glucose que compõem a cadeia polimérica) (WUCHERPFENNIG *et al.* 1984; CRACHEREAU *et al.* 2001). Dependendo das condições de reacção adoptadas no processo de produção, é possível obter-se CMC's com diferentes graus de polimerização e de substituição (CRACHEREAU *et al.* 2001).

Assim, o objectivo do presente trabalho foi avaliar o impacto de diferentes CMC's e diferentes doses de aplicação na estabilidade tartárica dos vinhos. Foram realizados ensaios em dois vinhos brancos para comparar os efeitos da aplicação dos CMC's sobre a diminuição da condutividade, composição mineral, teor de ácido tartárico e características sensoriais.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 –Vinhos

No presente trabalho foram utilizados dois vinhos brancos da colheita de 2010, um da Região Demarcada do Douro e outro da Região Demarcada dos Vinhos Verdes, ambos com instabilidade tartárica. As características químicas dos vinhos eram respectivamente, teor alcoólico (v/v) 13,0 e 12,5%; acidez total 6,6 e 8,3 g/L (expresso em ácido tartárico); acidez volátil 0,23 e 0,30 g/L (expresso em ácido acético); pH 3,11 e 3,17; teor de ácido tartárico 2,32 e 3,05 g/L; potássio 483 e 670 mg/L e variação da condutividade eléctrica no teste de mini-contacto (Δx) de 63 e 98 \square S/cm.

2.2 - Tratamentos de estabilidade tartárica

Foram testados quatro CMC's (A, B, C, e D) em duas concentrações, média (D1 - 5 g/hL) e máxima (D2 - 10 g/hL) de acordo com as doses autorizadas pelo OIV (2012). O ensaio de estabilidade tartárica foi efectuado para cada um dos vinhos em provetas de 250 mL. O vinho sem aditivo foi considerado o controlo. Os aditivos foram cuidadosamente adicionados a cada vinho e permaneceram, durante 7 dias a 20 °C em contacto com o vinho. As amostras foram centrifugadas a 537,6 \times g durante 15 minutos antes de serem analisadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.3 - Teste do mini-contacto

O teste do mini-contacto consiste em medir a variação da condutividade eléctrica (Δx) de um vinho, à temperatura de 0 °C, sob agitação contínua, e 15 min após a adição de cristais de bitartarato de potássio micronizados (BULLIO 2002). Nesta análise, foi utilizado um equipamento Tartar Check (Ing. C. Bullio, San Prospero, Itália). A variação de condutividade eléctrica (Δx), expressa em \square S/cm, indica o nível de estabilidade (Δx)

< 30 muito estável, 30 - 50 estável, 50 - 70 em risco e > 70 instável.

2.4 - Composição mineral

Os catiões potássio, cálcio, sódio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (OIV 2012).

2.5 - Ácido tartárico

A determinação do ácido tartárico foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Rebelein modificado por Vidal e Blouin (REBELEIN, 1969).

2.6 - Análise físico-química sumária

Teor alcoólico % (v/v), pH, acidez total e acidez volátil foram determinados de acordo com os métodos descritos pela OIV (2012).

2.7 - Grau de substituição das CMC's

Para a determinação do grau relativo de substituição da CMC foi utilizado a quantidade relativa de glucose e glucose carboximetilada, determinada por cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica por pulsos após hidrólise ácida (1M H₂SO₄, 2,5 h). A separação foi realizada com uma coluna (150 mm x 3 mm) CarboPac PA-20 e uma pré-coluna (Dionex) CarboPac PA20, utilizando eluente A - 1,25 mM de solução de NaOH contendo 2 mM de Ba(OH)₂, eluente B - 400 mM de acetato de sódio contendo 2 mM de Ba(OH)₂ e eluente C - 500 mM NaOH contendo 2 mM de Ba(OH)₂. O volume de injeção foi de 5 µl, a um taxa de fluxo de 0,3 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. O programa de eluição utilizado foi: 0 – 19 min, 100 % de A, B para aumentar 50 % até 27 min e mantida até 37 min, aumento para 40 % C e decrescendo para 0 % B até 47 min e mantida até 57 min. A coluna foi condicionada com 100 % de A durante 15 min antes da injeção. O detector eletroquímico consistiu de um eléctrodo de trabalho Au, o eléctrodo de referência de Ag/AgCl e o eléctrodo contador Ti. O grau de substituição relativo foi calculado como a razão da área da glucose em relação à área da glucose carboximetilada. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.8 - Viscosidade

A viscosidade foi determinada de acordo com GÓMEZ-DÍAZ e NAVAZA (2002). Foram preparadas cinco soluções com concentrações distintas, de 1; 0,7; 0,5; 0,3 e 0,2 g/L solução de CMC (composição do tampão 1 g CMC/1L NaCl a 0,1 M). Para uma das CMC's foi utilizada uma concentração diferente, 2; 1,4; 1; 0,6 e 0,4 g/L, devido à baixa viscosidade. A viscosidade relativa foi medida com um viscosímetro Ubbelohde ASTM D2515 capilar a $20 \pm 0,1$ °C em banho-maria. A viscosidade intrínseca é definida como:

$$[\eta] = (\eta_{red})_{c \rightarrow 0}$$

Foi obtido por extrapolação dos dados de concentração de viscosidade reduzida versus concentração zero. A interceção no eixo das abcissas é a viscosidade intrínseca. O peso molecular foi calculado com base na equação de Mark Houwink:

$$[\eta] = KM^a$$

Com $K = 0,00123$, $a = -0,91$.

A análise foi realizada em triplicado.

2.9 - Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por um painel treinado. As amostras foram apresentadas ao painel em copos de prova, marcados com três dígitos e numa ordem aleatória. Dez atributos foram seleccionados: aspecto (cor, limpidez), aroma (frutado, floral, vegetal, especiarias, químico) e sabor (doce, amargo, persistência, acidez, equilíbrio). Os atributos foram quantificados através de uma escala de intensidade de dez pontos (ISO 4121:2003).

2.10 - Análise estatística

Os dados físico-químicos e sensoriais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica 6. As diferenças entre os valores médios foram efetuadas com o teste Tukey ($p < 0,05$) para os dados físico-químicos e com o teste de Duncan ($p < 0,05$) para os dados da análise sensorial.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Viscosidade e grau de substituição das CMC's

As quatro CMC's analisadas apresentaram diferentes valores de viscosidade e de grau de substituição (figura 1). A viscosidade das CMC oscilou entre 1,03 mPa/s (CMCC) a 1,35 mPa/s (CMCD) e o grau de substituição variou de 0,89 para a CMC mais substituída (CMCA) a 1,58 para a CMC menos substituída (CMCD).

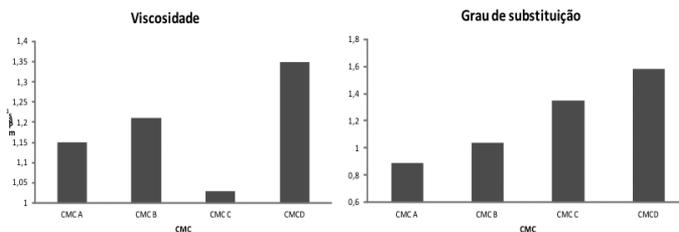


Figura 1 – Viscosidade e grau de substituição das CMC em estudo.

3.2 – Efeito da adição da carboximetilcelulose na estabilização tartárica dos vinhos

A condutividade decresceu significativamente ($p < 0,05$) após a adição das quatro CMC's em ambos os vinhos em estudo (figura 2 e 3). Contudo, o efeito do tipo e concentração de CMC variou em função do vinho. Assim, no Vinho Verde, que tinha uma instabilidade tartárica superior, o grau de substituição das CMC's, teve um efeito na estabilização tartárica superior. Além disso, a concentração de CMC aplicada, tem também um efeito dependente do grau de substituição.

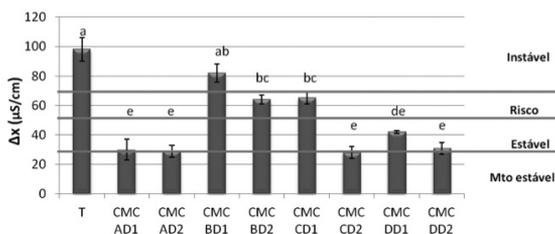


Figura 2 – Decréscimo da condutividade após adição das diferentes CMC's no vinho branco Verde. T- vinho sem tratamento, CMC's (A, B, C, e D) em duas concentrações (D1 - 5 g/hL; D2 - 10 g/hL). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

No que diz respeito ao tipo de CMC, o CMCA apresenta o grau de substituição mais elevado (figura 1), e é o CMC que proporciona o decréscimo mais elevado da condutividade eléctrica (Δx) quando comparado com o vinho sem tratamento (figura 2). Para as outras CMC's usadas, que apresentam um grau de substituição inferior do que a CMCA, a concentração de CMC tem também um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a estabilização tartárica, no entanto, a concentração mais alta proporciona um decréscimo superior nos valores de Δx em relação à concentração mais baixa.

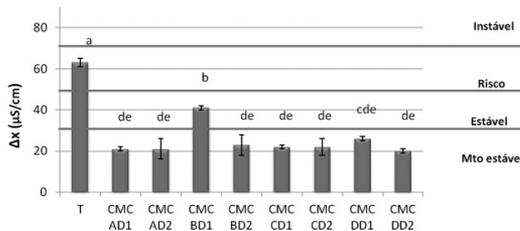


Figura 3 – Decréscimo da condutividade após adição das diferentes CMC's no vinho branco Douro. . T- vinho sem tratamento; CMC's (A, B, C e D) em duas concentrações (D1 - 5 g/hL; D2 - 10 g/hL). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Tukey).

O vinho branco Douro apresentou uma menor instabilidade tartárica inicial, tendo-se verificado menor efeito do grau de substituição e da concentração da CMC aplicada na redução dos valores de Δx , com exceção do CMCB que teve a menor capacidade de reduzir os valores de Δx , como aconteceu para o Vinho Verde descrito anteriormente (figura 3).

3.2 – Composição mineral e teor em ácido tartárico

Após adição dos diferentes tipos e concentrações de CMC's, não foram observadas diferenças significativas no teor em ácido tartárico, potássio, cálcio e magnésio relativamente à testemunhas em ambos os vinhos. No entanto, observou-se um aumento do teor em sódio em todos os vinhos após a aplicação das diferentes CMC's (figura 4). Este aumento pode ser explicado pela transferência de sódio da CMC's para o vinho, uma vez que estas têm na sua constituição sódio.

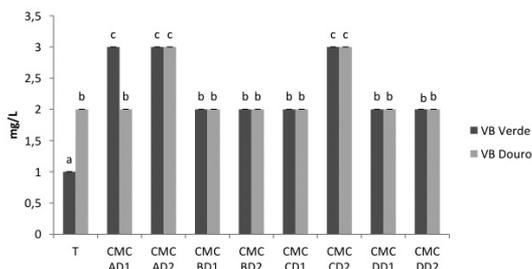


Figura 4 - Teor de sódio no vinho branco Douro e Verde após adição das diferentes CMC's. T- vinho sem tratamento, CMC's (A, B, C, e D) em duas concentrações (D1 - 5 g/hL; D2 - 10 g/hL). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o parâmetro avaliado (teste Scheffler).

3.3 - Análise sensorial

O perfil sensorial dos vinhos é ilustrado na Figura 5, sendo o valor médio atribuído pelos provadores a cada um dos atributos marcado no eixo correspondente.

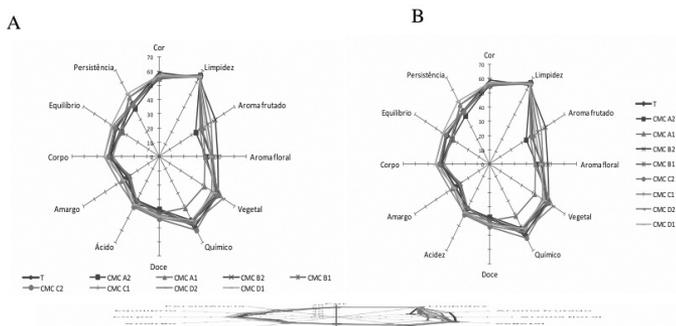


Figura 5 - Descritor do aspeto, aroma e sabor dos vinhos brancos Douro (A) e Vinho Verde (B) após aplicação das diferentes carboximetilcelulose de sódio. T- vinho sem tratamento, CMC's (A, B, C, e D) em duas concentrações (D1 - 5 g/hL; D2 - 10 g/hL).

Na análise sensorial dos Vinho Verde e Douro os provadores não detectaram diferenças significativas entre as amostras de vinho tratadas com diferentes CMC. Apesar dos provadores não terem detectado diferenças podemos dizer pela análise da figura 5 (B), que a adição de CMC D1 se destacou em relação ao atributo frutado e floral, enquanto o CMC A2 se destacou no atributo vegetal.

4 - CONCLUSÕES

Após a adição das diferentes CMC's aos vinhos, verificou-se um decréscimo significativo da condutividade. Verificou-se também, uma relação directa entre a concentração das CMC's aplicadas e o decréscimo da condutividade do vinho. No entanto, o efeito dos diferentes tipos de CMC (grau de substituição) e concentrações aplicadas depende também da matriz do vinho (condutividade inicial, teor de potássio e de ácido tartárico). Todos os CMC's utilizados não alteraram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de ácido tartárico, composição mineral e as características sensoriais dos vinhos. Contudo, o uso das CMC's aumentou a concentração de sódio nos vinhos, o que está relacionado com a sua composição.

5 - AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Unidade de Microbiologia e Biotecnologia do Vinho IBB/CGB-UTAD e pelo Centro de Química (CQ-UTAD). Agradecimentos adicionais para a SAI, AEB Bioquímica Portuguesa, S. A, Enartis, Aveleda S.A., APVV e Sogevinus pelo fornecimento de vinhos e de agentes de colagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWYER P.; GOUTY C.; MOINE V.; MARCH R.; BATTAGLENE T. (2010). CMC: a new potassium bitartrate stabilisation tool. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 558, 65-68.
- BULLIO C. (2002). TartarCheck. User's Handbook. Version 5/2/02.
- CANTARELLI C. (1963). Prévention des précipitations tartriques. *Annales de Technologie Agricole*, 12, 343-359.
- CARDOSO A. D. (2007). *O vinho da uva à garrafa*. Portugal: Lisboa.
- CRACHEREAU J.C.; GABAS N.; BLOUIN J.; HÉBRARD B.; MAUJEAN A. (2001). Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose. *Bulletin de l'OIV*, 841-842.
- GÓMEZ-DÍAZ D.; NAVAZA J.M. (2002). Rheological characterization of aqueous solutions of the food additive carboxymethylcellulose. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 1, 12-22.
- ISO 4121:2003. Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative responsescales. Retiradode: <http://www.iso.org/iso/search.htm?qt=ISO+4121%3A2003&searchSubmit=Search&sort=rel&type=simple&published=on>
- KLIEWER M. W.; HOWARTH L.; OMARI M. (1967). Concentration of tartaric and malic acid and their salts in *Vitis vinifera* grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18, 42-54.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin). (2012). *Code International des Pratiques Oenologiques*. France: Paris.
- REBELEIN H. 1969 Dosage rapide de l'acide tartrique. Office International de la Vigne et du Vin.
- RIBÉREAU-GAYON P.; GLORIES Y.; MAUJEAN A.; DUBOURDIEU D. (2006). *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Volume 2*. (2nd Edition). France: Bordeaux.
- SANTOS P. C.; Pereira O. M.; Simões F. J.; Pinho T. M. N. (2000). Ensaios de estabilização tartárica em vinhos portugueses: estudo comparativo da eletrodialise e de um método tradicional. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 15, 95-108.
- WUCHERPFENNIG K.; DIETRICH, H.; GÖTZ, W.; RÖTZ S. (1984). Einfluß von Kolloiden auf die Weinstekristallisation unter besonderer Berücksichtigung der Weinstabilisierung durch Carboxymethylcellulose. *Die Weinwirtschaft-Technik*, 1, 13-23.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DESALCOOLIZADO RESULTANTE DA DESTILAÇÃO VÍNICA

Fernando J. GONÇALVES^{1,2}; Sílvia M. ROCHA²; Manuel A. COIMBRA²

RESUMO

O resíduo desalcoolizado resultante do processo de destilação vínica utilizado para a produção de aguardente pode ser uma importante fonte de compostos bioativos, os quais estão associados a efeitos benéficos para a saúde humana. A fim de caracterizar estes compostos, dois vinhos tintos foram evaporados durante 1h à pressão atmosférica, permitindo obter os respetivos resíduos desalcoolizados. Os resultados obtidos colorimetricamente mostraram quantidades comparáveis de antocianinas, taninos, fenóis totais e de atividade antioxidante, para os vinhos e para os respetivos resíduos desalcoolizados.

Palavras chave: Vinho, Desalcoolização, Compostos bioativos, Atividade antioxidante

1. INTRODUÇÃO

A destilação dos vinhos é realizada para obter aguardente vínica, necessária para a fortificação de bebidas, nomeadamente o vinho do porto. No processo de destilação, o vinho é sujeito a condições de temperatura e acidez elevada, do qual resulta um resíduo líquido desalcoolizado (vinho desalcoolizado), que representa cerca de 85% do total de vinho. A este resíduo não é, normalmente, dado nenhum préstimo. No entanto, estão presentes compostos fenólicos com as suas características bioativas ou, eventualmente, modificados pelas condições da destilação vínica. Os principais compostos fenólicos do vinho tinto são as antocianinas, as proantocianidinas, catequinas e os ácidos fenólicos (Katalinic et al., 2004). Os benefícios para a saúde humana do consumo moderado de vinho estão associados aos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos.

¹ *CI&DETS, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, Portugal*

² *QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*

Apesar dos estudos realizados sobre a composição fenólica e a atividade antioxidante de vinhos, existe ainda apenas um reduzido número de publicações sobre o efeito da destilação sobre estes parâmetros. Assim, este estudo teve como objetivos a caracterização da composição fenólica geral dos vinhos e dos respetivos vinhos desalcoholizados, bem como a avaliação do efeito do processo de destilação na atividade antioxidante dos vinhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Neste estudo foram usados dois vinhos tintos da região do Dão, dos anos de 2006 (VT1) e 2009 (VT2). O VT1 foi produzido a partir de uvas das castas Touriga Nacional, Tinta Roriz e Jaen (~2:1:1) com um período de maceração de 8 dias; o VT2 era um vinho monovarietal produzido a partir da casta Touriga Nacional, com uma maceração de 12 dias.

Cada vinho foi evaporado à temperatura ambiente até 75% do seu volume inicial, dando origem aos respetivos vinhos desalcoholizados (VD1 e VD2). No sentido de comparar a composição de VT1 com VD1 e de VT2 com VD2, foi adicionado, aos vinhos desalcoholizados, um volume de água destilada igual ao volume removido durante a desalcoholização.

2.2 Compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Gonçalves et al. (2012). Os resultados foram expressos em mg/L em equivalentes de ácido gálico (GAE).

2.2 Antocianinas Totais

A determinação das antocianinas totais fez-se de acordo com o método descrito por Cheynier et al. (1989) e Boulton (2001). O teor em antocianinas nas uvas foi expresso em mg/L em equivalentes de malvidina 3 glucósido (EMv3G).

2.3 Taninos Totais

O teor em taninos totais foi determinado de acordo com o método descrito por Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965). Os resultados foram expressos em g/L.

2.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante total das amostras foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS, seguindo as condições descritas por Brand-Williams et al. (1995) e Miller et al. (1993), respetivamente.

2.5 Fracionamento dos Compostos Fenólicos

O fracionamento dos compostos fenólicos foi feito por adaptação do procedimento descrito por Sun et al. (2006).

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A composição fenólica geral dos vinhos tintos (VT1 e VT2) e dos respetivos vinhos desalcooolizados (VD1 e VD2) está apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Composição fenólica geral dos vinhos tintos e dos respetivos vinhos desalcooolizados.

Amostras	Compostos Fenólicos Totais (mg/L GAE)	Taninos (g/L)	Antocianinas Totais (mg/L EMv3Glc)
VT 1	1318 ± 19	1,21 ± 0,12	241,4 ± 7,3
VD 1	1323 ± 37	1,17 ± 0,18	234,4 ± 4,1
VT 2	3071 ± 81	1,62 ± 0,21	415,4 ± 23,2
VD 2	3040 ± 39	1,56 ± 0,11	421,4 ± 14,7

Média ± desvio padrão. GAE- equivalentes de ácido gálico; Mv3Glc-malvidina 3-glucosídeo.

O VT1 continha 1318 mg/L de compostos fenólicos totais, expressos como equivalentes de ácido gálico, enquanto o VT2 continha 3071 mg/L. Dois dos fatores que podem explicar esta diferença são as castas usadas para a elaboração dos vinhos e a duração da maceração pelicular. O VT2 foi produzido a partir da casta Touriga Nacional, com uma maceração mais longa, quando comparado com o VT1, produzido a partir de uma mistura das castas Touriga Nacional, Tinta Roriz e Jaen. Da mesma forma, Jordão et al. (2012) descreveram valores mais elevados de compostos fenólicos totais para um vinho da casta Touriga Nacional, quando comparado com um vinho da casta Tinta Roriz. Os valores quantificados para o VD1 e VD2 foram 1323 e 3040 mg/L, respetivamente, muito semelhantes aos respetivos vinhos.

Relativamente ao conteúdo em taninos totais, o VT1 (1,21 g/L) e o VT2 (1,62 g/L) continham valores estatisticamente semelhantes ao VD1 (1,17 g/L) e VD2 (1,56 g/L). O

VT2 continha um valor (415,4 mg/L EMv3Glc) de antocianinas totais superior ao VT1 (241,4 mg/L EMv3Glc). Por observação da tabela 1, é possível verificar que os vinhos desalcooolizados apresentavam teores de antocianinas totais semelhantes aos vinhos tintos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Bogianchini et al. (2011), que descreveram teores de antocianinas e de taninos semelhantes em vinhos e nos respectivos vinhos desalcooolizados por osmose inversa.

O VT2 continha quantidades superiores dos parâmetros fenólicos analisados quando comparado com o VT1, o que pode ser explicado pela maceração mais longa a que o VT2 foi sujeito. A composição fenólica geral semelhante dos vinhos e dos respectivos vinhos desalcooolizados analisados mostra que o processo de desalcooolização à temperatura ambiente não originou perda significativa de compostos fenólicos.

Os resultados de atividade antioxidante determinada pelos métodos do ABTS e DPPH, para os vinhos e dos respectivos vinhos desalcooolizados estão descritos na figura 1.

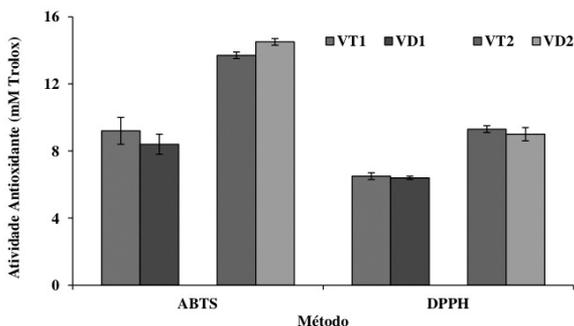


Figura 1: Atividade antioxidante dos vinhos e dos respectivos vinhos desalcooolizados determinada pelos métodos do ABTS e DPPH.

Os valores obtidos pelo método do ABTS foram 9,2 (VT1) e 13,7 (VT2) mM de equivalentes trolox e 6,5 (VT1) e 9,3 (VT2) mM de equivalentes trolox, quantificados pelo método do DPPH. Estes valores estão de acordo com os descritos para a atividade antioxidante de vinhos tintos, compreendidos entre 4,0 e 17,4 mM e entre 2,2 e 11,1 mM TE pelos métodos do DPPH e ABTS, respetivamente (Fernandez-Pachón et al., 2004;

Villano et al., 2006). Os valores de atividade antioxidante quantificados para os vinhos desalcooolizados era estatisticamente semelhante aos obtidos para os respetivos vinhos, independentemente do método utilizado.

Para avaliar a contribuição de cada classe de compostos fenólicos para atividade antioxidante dos vinhos, estes foram fracionados por extração em fase sólida, permitindo obter 4 frações. A fração 1 era principalmente constituída por ácidos fenólicos, a fração 2A por flavanóis monoméricos e flavonóis, a fração 2B por procianidinas oligoméricas e a fração 3 por antocianinas e procianidinas poliméricas.

A figura 2 mostra valor da atividade antioxidante de cada fração, determinada pelo método ABTS, expressa em mmol de trolox por massa de composto fenólico.

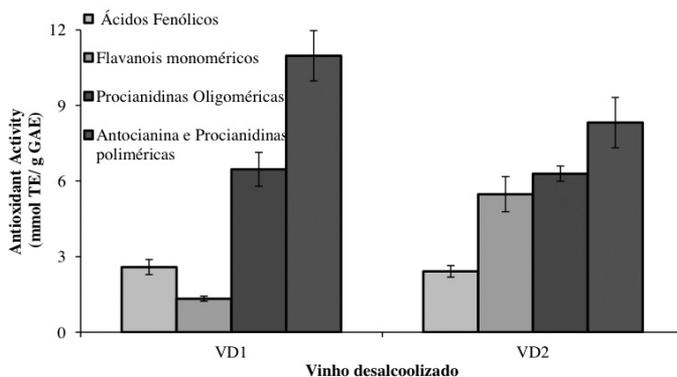


Figura 2: Atividade antioxidante relativa (mmol ET/g EAG) dos compostos fenólicos presentes nas diferentes frações.

Os resultados mostram que a fração composta por antocianinas e procianidinas monoméricas tinha maior atividade antioxidante por grama de composto fenólico, seguida pela fração rica em procianidinas oligoméricas. A atividade antioxidante depende, não só, do total de compostos fenólicos, mas da atividade antioxidante dos compostos individuais presentes em cada fração.

A contribuição das diferentes frações de compostos fenólicos, para a atividade antioxidante dos vinhos, tendo em conta a sua quantidade relativa nos mesmos, está apresentada na figura 3.

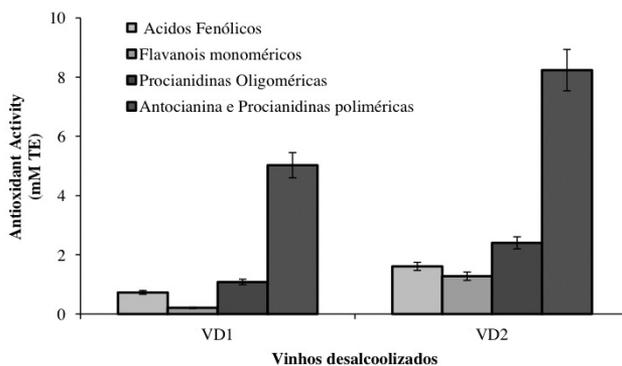


Figura 3: Atividade antioxidante (mM TE) das diferentes frações de compostos fenólicos dos vinhos desalcooolizados.

O VD1 e VD2 apresentaram a mesma ordem de reatividade das frações, sendo que a fração rica em antocianinas e em procianidinas monoméricas representava entre 71 e 61% da atividade antioxidante de VD1 e VD2, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com vários estudos (Xanthopoulou et al. 2010; Simonetti et al., 1997; Wang et al, 1997), os quais mostram que a fração rica em antocianinas era mais importante para a atividade antioxidante de vinhos tintos.

4.CONCLUSÕES

Os dois vinhos e os correspondentes vinhos desalcooolizados continham quantidades de compostos fenólicos totais, de taninos e de antocianinas semelhantes.

Apesar das diferenças dos métodos utilizados, os resultados obtidos permitem concluir que o processo de desalcooolização usado não teve alteração significativa na atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes.

Os resultados mostram que a fração não alcoólica do vinho pode ser uma importante fonte de compostos com propriedades bioativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bogianchini, M.; Cerezo, A. B.; Gomis, A.; Lopez, E.; Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Stability, antioxidant activity and phenolic composition of commercial and reverse osmosis obtained dealcoholised wines. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1369-1375.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 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.
- Gonçalves, F.J.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A. (2012) Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. *Food Chemistry*, 134(2), 957-963.
- Jordão, A.M.; Simões, S.; Correia, A.C.; Gonçalves, F.J. (2012) Antioxidant activity evolution during portuguese red wine vinification and their relation with the proanthocyanidin and anthocyanin composition. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36 (4), 298-309.
- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86(4), 593-600.
- Miller, N. J.; Riceevans, C.; 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. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.
- Ribereau-Gayon, P.; Stonestreet, E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et determination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48, 188-196.
- Simonetti, P., Pietta, P., & Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1152-1155.
- Villano, D.; Fernandez-Pachon, M. S.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95(3), 394-404.
- Wang, C. C., Chu, C. Y., Chu, K. O., Choy, K. W., Khaw, K. S., Rogers, M. S., & Pang, C. P. (2004). Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry*, 50(5), 952-954.
- Xanthopoulou, M. N., Fragopoulou, E., Kalathara, K., Nomikos, T., Karantonis, H. C., & Antonopoulou, S. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*, 120(3), 665-672.

FERMENTAÇÃO E ESTÁGIO DE VINHO ROSÉ EM MADEIRA

Avaliação das suas potencialidades

Paula BRAGANÇA ⁽¹⁾; Óscar GATO ⁽²⁾; Olga LAUREANO ⁽¹⁾, Jorge RICARDO DA SILVA ⁽¹⁾.

RESUMO:

O vinho rosé tem sido procurado pela sua frescura, estrutura leve e aroma intenso, mas enquanto o vinho branco “evoluiu” com várias técnicas de vinificação (maceração pré-fermentativa, fermentação e estágio em barrica, etc) a vinificação de vinho rosé estagnou.

Surgiu então o interesse do presente trabalho: um ensaio elaborado na Adega de Borba de fermentação e estágio de vinho rosé em barrica e em inox com aduela, à semelhança da técnica amplamente utilizada na vinificação de vinhos brancos. A caracterização dos compostos fenólicos e da cor, aliada à análise sensorial efectuada, permitiram demonstrar as principais diferenças das seis modalidades. Destaca-se especialmente a apreciação global superior dos vinhos fermentados e estagiados em barrica de carvalho americano e francês, cujas notas a baunilha e *boisé* aumentaram a complexidade do carácter frutado.

Palavras-chave: Vinho rosé, fermentação em barrica, estágio em barrica, aduelas.

1.INTRODUÇÃO

A definição de vinho rosé assenta geralmente na caracterização da sua cor, independentemente do seu modo de elaboração. É tido como um tipo intermédio entre o vinho tinto e o branco, partilhando com o primeiro as castas utilizadas e parte do teor em compostos fenólicos, nomeadamente as antocianinas. Ao vinho branco assemelha-se pela estrutura leve, teor alcoólico equilibrado, frescura e aromas frescos e frutados (Fauvet e Guittard, 1998). Estas características parecem ter despertado interesse nos consumidores, o que

(1) Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. E-mail: paulinha_braganca@hotmail.com; jricardosil@isa.utl.pt, olgalau-reano@isa.utl.pt.

(2) Adega de Borba, Largo Gago Coutinho e Sacadura Cabral, 25. Apartado 20-7151-913, Borba, Portugal. E-mail: Oscar.Gato@adegaborba.pt.

não deve significar que não se experimentem novas técnicas e estilos de vinho rosé. De entre os métodos de elaboração de vinhos rosé, a prensagem directa/”bica-aberta” e a maceração pré-fermentativa e/ou sangria seguidos de fermentação em fase líquida, são talvez os mais comuns. Tem-se excluído a técnica de fermentação e estágio em madeira, utilizada para aumentar a complexidade aromática dos vinhos, nomeadamente os brancos. Esta técnica é muitas vezes complementada com a utilização das borras, por terem um poder redutor forte, capacidade de diminuir o impacto sensorial da madeira (Chattonnet et al., 1992) e permitem melhorar a sua qualidade organoléptica, através dos compostos libertados na autólise das leveduras (Barrio-Galán et al., 2011). Dado estes aspectos, foi testado neste trabalho a fermentação e estágio do vinho rosé em barrica e em inox com aduela. Foi mantida uma Testemunha que permaneceu durante todo o processo de vinificação e conservação em inox, sem contacto com madeira.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vinho

Foram utilizadas as uvas da vindima de 2012 dos sócios da Adega de Borba, localizada na cidade de Borba, distrito de Évora. As castas utilizadas neste vinho rosé foram Aragonez ($\pm 37\%$), Touriga Nacional ($\pm 26\%$), Trincadeira ($\pm 15\%$), Syrah ($\pm 8\%$), Cabernet Sauvignon ($\pm 6\%$) e outras ($\pm 8\%$).

O método de vinificação utilizado foi semelhante ao da fermentação e estágio de vinho branco com madeira e com băttonage, destacando-se apenas a maceração pelicular a frio (8h) e passagem do mosto, apenas após o arranque de fermentação a densidade de cerca de 1070, para as barricas e sempre-cheios de inox com aduelas. Todos os depósitos foram colocados na sala de frio, a uma temperatura de 16°C. Destaca-se igualmente que durante a fase de estágio se detectaram aromas intensos a reduzido, optando-se por trasfegar com arejamento as barricas e sempre-cheios, de modo a separar as borras. Após lavagem dos depósitos, estes foram de novo atestados e sulfitados.

2.2 Delineamento experimental

Um total de 6 modalidades de vinho rosé foram testadas neste trabalho: **Testemunha**, mantido sempre em cuba de inox, sem qualquer contacto com madeira, **CF - 1 barrica**

nova de carvalho francês (225 L, tosta média, grão fino), **CA** - 1 barrica nova de carvalho americano (225 L, tosta média, grão fino), **CP** - 1 barrica nova de carvalho português (225L, tosta média, grão fino), **Ad CF** - 1 sempre-cheio de 60 L com aduela de carvalho francês (1 aduela/hL, tosta média), **Ad CA** - 1 sempre-cheio de 60 L com aduela de carvalho americano (1 aduela/hL, tosta média).

2.3 Composição físico-química geral dos vinhos

O vinho foi analisado semanalmente através da tecnologia FTIR (Espectrometria de Infravermelhos por Transformada de Fourier) no *WineScanTM*, em relação aos seguintes parâmetros: massa volúmica, teor alcoólico em volume, acidez volátil, acidez total, extrato seco, pH, açúcares redutores, ácido málico, ácido láctico, índice de polifenóis totais a $A_{280\text{nm}}$, SO_2 livre e SO_2 total.

2.4 Caracterização da cor

Para determinar a Intensidade (IC) e a Tonalidade (T) da cor dos vinhos rosé foi utilizado o método de Saudraud modificado (OIV, 2013).

Para a medição e cálculo das características cromáticas dos vinhos, através dos valores tristimulares (X, Y, Z), de acordo com a Comissão International de l'Éclairage (CIE, 1986), utilizou-se o método espectrofotométrico com o auxílio de um programa de computador.

A Cor devido à co-pigmentação (CC) foi determinada segundo o método proposto por Boulton (2001), usando-se a fórmula de Gutiérrez (2003).

2.5 Determinação dos compostos fenólicos globais

Antocianinas coradas (Ac), Antocianinas totais (At), Grau de ionização de antocianinas(α), Pigmentos Totais (Pt), Índice de Polimerização de Pigmentos (IPP) e Índice de Polifenóis Totais (IPT) foram avaliados pelo método de Somers e Evans (1977). Os Pigmentos Poliméricos (Pp) calculados segundo o método de Somers (1971).

2.6 Determinação da superfície de contacto da madeira/ volume de vinho

Considerou-se a área das barricas como a de um cilindro de altura h e raio r (r é a média

entre o raio do topo e o raio da barriga da barrica) e a área da aduela a área total de um paralelepípedo de comprimento a , largura b e altura c ($A_{\text{barrica}} = (2pr \times h) + (2pr^2)$ e $A_{\text{aduela}} = 2ab + 2bc + 2bc$). As medidas foram retiradas dos catálogos das marcas utilizadas no ensaio e os valores resultantes das áreas divididas pelo volume de vinho que continham.

2.7 Análise sensorial

Os diferentes vinhos foram submetidos a uma cuidada análise sensorial, constituindo-se um painel de 13 provadores especializados e treinados do Instituto Superior de Agronomia e da Adega de Borba, de modo a identificar as principais diferenças dos vinhos rosé deste ensaio. Criou-se uma ficha de prova descontínua com atributos hedónicos e discriminativos, com escala para Cor, Aroma e Gosto (1 – Inexistente, 2 a 5 – Excelente) e para Equilíbrio e Apreciação Global (1 – Mediocre a 5 – Excelente).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando o Quadro 1 conclui-se que os valores estão dentro dos limites legais estabelecidos pelo Instituto da Vinha e do Vinho. Todos apresentam uma acidez elevada, pH baixo e estão tecnicamente secos. De notar que, pela quantificação do ácido málico e láctico, os vinhos não realizaram a fermentação maloláctica. No Quadro 2, a Intensidade da cor (IC) dos vinhos Testemunha e Ad CF é ligeiramente superior, além de serem os vinhos com o vermelho (a^*) mais pronunciado (Fig.1) e Cromo (c^*) mais elevado. A Tonalidade (T) é superior nos vinhos com madeira, o que indica maior predominância da absorvência a 420nm (amarelo). Os valores de b^* são positivos (amarelo) para todos os vinhos e é mais marcada nos vinhos Ad CA e Ad CF (Fig.1). A maior luminosidade (L^*) dos vinhos em barrica pode dever-se à clarificação espontânea existente nas barricas, tornando os vinhos mais límpidos e brilhantes (Quadro 2). As Antocianinas Coradas (Ac), Antocianinas Totais (At) e o Grau de Ionização das Antocianinas (ϑ) são superiores no vinho Testemunha (Quadro 2). A presença de madeira parece influenciar a concentração em antocianinas, especialmente em barrica, cuja superfície de contacto por volume de vinho é 10x superior à superfície de contacto das aduelas (109 e 11,5 cm²/vol

vinho, respectivamente). A presença de madeira parece favorecer o declínio das antocianinas (Jordão et al, 2006) e/ou ter capacidade de absorver polifenóis do vinho (Barrera-García et al, 2007). Os valores de Pigmentos Totais (Pt) são muito semelhantes, embora para a Testemunha, Ad CA e CP sejam ligeiramente superiores. Os Pigmentos Poliméricos (Pp) e o Índice de Polimerização de Pigmentos (IPP) são ligeiramente superiores para os vinhos estagiados com aduelas (Quadro 2). A maior polimerização pode dever-se ao maior contacto com o oxigénio (Perez-Prieto et al., 2003).

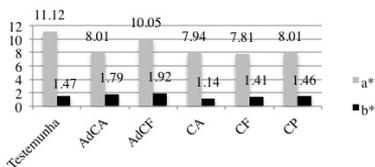
Quadro 1 – Resultados das análises sumárias realizadas no WineScanTM.^a

	MV	TA	AV	AT	EST	pH	A.Red	Málico	Láctico	IPT	SO2L	SO2T	Data
Testemunha	0,993	12,5	0,32	6,61	24,1	3,14	2,3	1,7	0	19,6	7	110	17-Dez
CA	0,992	12,9	0,37	6,71	22,7	3,15	1,1	1,8	0	18,2	9	103	17-Dez
CF	0,992	12,9	0,37	6,72	22,7	3,14	1,1	1,9	0	18	9	102	17-Dez
CP	0,992	12,9	0,37	6,80	22,8	3,13	1,2	1,8	0	18,9	9	97	17-Dez
Ad CA	0,992	12,6	0,35	6,65	22,3	3,12	1,1	1,7	0	17,7	5	104	17-Dez
Ad CF	0,992	12,6	0,34	6,71	22,4	3,11	1,2	1,7	0	17,5	5	104	17-Dez

Quadro 2 – Valores para a IC e T da cor, L*, c*, h*, Ac, At, θ , Pt, Pp, e IPP dos seis vinhos.^a

Amostra	IC (u.a)	T (u.a)	L*	c*	h*	Ac (mg/L)	At (mg/L)	θ (%)	Pt (u.a)	Pp (u.a)	IPP (%)
Testemunha	2,081	0,478	93,86	11,21	0,13	21	106	20	5,76	0,28	5
Ad CA	1,948	0,685	93,43	8,21	0,22	11	104	11	5,96	0,46	8
Ad CF	2,101	0,553	94,33	10,24	0,19	18	97	19	5,45	0,37	7
CA	1,619	0,539	95,78	8,03	0,14	15	99	15	5,35	0,25	5
CF	1,584	0,572	95,65	7,94	0,18	14	94	15	5,15	0,26	5
CP	1,652	0,573	95,58	8,15	0,18	14	104	14	5,66	0,27	5

Fig.1 – Valores das coordenadas CIE a* e b* dos seis vinhos.^a



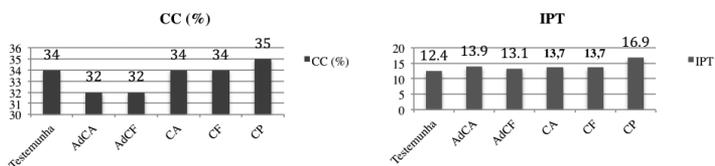
s : CP – barrica de carvalho português ; Ad CF – sempre-cheio com ho americano.

Segundo Boulton (2001) os vinhos tintos jovens podem apresentar Cor devido à Copigmentação (CC) de 30 a 50%. Os vinhos rosé em estudo encaixam no intervalo de CC dos vinhos tintos jovens (Fig.2), provavelmente por conterem cerca do dobro da concentração em antocianinas referida por Boulton (2001) para rosés (50mg/L). Pela Fig.3 conclui-se que os vinhos com madeira apresentam um Índice de Polifenóis Totais (IPT) superior ao vinho Testemunha, evidenciando a transferência de compostos fenólicos da madeira para o vinho, especialmente em CP. Jordão *et al.* (2007) confirmam o maior teor em elagitaninos, ácido elágico e compostos fenólicos voláteis (após queima) do carvalho português quando comparado com o americano e francês. Analisando o Quadro 3, existiu penalização das Ad CA e Ad CF, embora não se deva traduzir na penalização da técnica de fermentação e estágio de vinho rosé com aduelas, mas sim na penalização do aroma oxidado. Destacam-se a CA e CF com uma apreciação global superior (Muito Bom), pela boa percepção da cor rosada e pelo bom equilíbrio do carácter frutado com as notas boisé, baunilha, côco e alguma especiaria. Ambos os vinhos mostraram também um bom corpo/volume de boca, frescura e persistência com notas de madeira em aroma retronasal. Segue-se o vinho rosé CP com uma classificação de Bom. Pode concluir-se que talvez o carvalho português não esteja tão adequado como as restantes espécies de carvalho, por mascarar mais os aromas frutados. O vinho Testemunha, com avaliação ligeiramente inferior, mas ainda no Bom, é conotado como um bom rosé clássico, com frescura e fruta no aroma.

Fig. 2 – Valores da cor devido à copigmentação dos seis vinhos.^a Fig 3 – Valores do IPT para os seis vinhos.^a

Quadro 3 – pontuações médias e desvio padrão da avaliação sensorial dos seis vinhos.^a

		T	dp	CA	dp	CF	dp	CP	dp	Ad CA	dp	Ad CF	dp
cor	Vermelho	2,5	0,7	2,9	0,8	2,9	0,76	3	0,58	4,2	0,6	3,9	0,64
	Rosado	3,7	0,8	3,3	1,3	3,4	1,33	3,4	1,19	2,9	1,12	3,2	0,9



^a CA – barrica de carvalho americano; CF – barrica de carvalho francês ; CP – barrica de carvalho português ; Ad CF – sempre-cheio com aduela de carvalho francês; Ad CA – sempre-cheio com aduela de carvalho americano.

	alaranjado	1,2	0,4	1,3	0,5	1,1	0,28	1,1	0,28	1,2	0,38	1,1	0,28
aroma	frutado silvestre	3,2	1,1	2,5	1,1	2,7	1,25	2	1,19	2,8	1,42	2,4	1,04
	frutado maduro	3,2	1	2,5	1	2,2	1,09	2,4	1,12	2,7	1,44	2,8	1,54
	Floral	2	0,9	1,5	0,5	1,5	0,66	1,5	0,66	1,6	0,96	1,5	0,78
	baunilha	1,4	0,7	2,8	0,8	2,5	0,97	2,4	1,04	1,3	0,48	1,5	1,13
	Cóco	1,2	0,4	2,3	1,4	1,6	0,65	1,8	0,73	1,3	0,85	1,5	0,97
	especiaria	1,3	0,6	2,1	1,0	2,2	1,09	2,5	0,97	1,5	0,88	1,5	0,66
	Boisé	1,5	0,7	3,2	1,3	2,9	1,19	2,9	0,86	1,8	1,24	1,6	0,77
	prancha/serradura	1,5	0,8	1,7	1,3	2	1,29	2,4	1,33	1,5	1,2	1,4	0,65
	frescura/acidez	3,8	0,8	3,7	1,0	4	0,71	3,6	0,96	3,8	1,09	3,9	0,86
Gosto	persistência	3,2	0,9	3,5	0,8	3,6	0,65	3,5	0,88	2,9	0,95	3,1	0,86
	corpo/volume de boca	2,9	0,6	3,9	0,6	3,6	0,65	3,8	0,73	2,9	0,9	3,2	0,69
	adstringência	1,3	0,5	1,6	0,9	1,9	0,95	2,2	0,93	1,9	0,95	1,9	0,99
	amargor	1,4	0,7	1,5	1,0	1,6	1,04	2,2	0,99	2,5	1,05	1,9	1,12
	madeira (retronasal)	1,5	0,7	3,2	0,9	2,9	0,8	3,5	0,97	1,9	1,44	2,2	1,21
	Apreciação Global	2,9	0,9	3,5	0,97	3,5	0,78	3,2	0,73	1,6	0,87	2,5	0,88

^a **T** – Testemunha; **Ad F** – sempre-cheio com aduela de carvalho francês; **Ad A** – sempre-cheio com aduela de carvalho americano; **CA** – barrica de carvalho americano; **CF** – barrica de carvalho francês ; **CP** – barrica de carvalho português.

4. CONCLUSÃO

Com a realização deste ensaio foi possível avaliar as potencialidades e os principais efeitos da aplicação de uma técnica amplamente utilizada na vinificação de vinhos brancos, a fermentação e estágio em contacto com madeira, em vinho rosé. Para tal, foram ensaiadas modalidades em inox, inox com aduela (carvalho francês e americano) e com barrica (carvalho francês, americano e português).

Ao fim de cerca de 3 meses de estágio, os vinhos apresentavam diferenças a nível das características da composição fenólica e da cor e diferenças ainda mais evidentes na análise sensorial.

Na composição fenólica e da cor podem destacar-se como principais diferenças: Superior IC dos vinhos Testemunha, Ad CA e Ad CF; Valores superiores de b* (amarelo) nos vinhos Ad CA e Ad CF que terão tendência a agravar-se com o tempo, dada a saturação do vinho em oxigénio; IPT superior nos vinhos fermentados e estagiados em madeira, com clara superioridade para o vinho CP.

Na análise sensorial das seis modalidades de vinho rosé destacaram-se: Testemunha mostra-se um rosé clássico com boa acidez e aromas frutados; Vinhos CA, CF e CP com boa frescura, melhor estrutura e volume de boca que os restantes, sem se mostrarem adstringentes ou amargos; Modalidade CA com notas mais evidentes a baunilha, côco e boisé; Modalidade CP com notas mais evidentes a especiaria, prancha/serradura e percepção a madeira pela via retronasal; Apreciação global superior para os vinhos CA e CF.

Deste modo, pode concluir-se que os vinhos rosé resultantes da fermentação e estágio em barrica de carvalho americano e francês foram preferidos ao vinho Testemunha e às restantes modalidades. Em relação à Testemunha, aumentaram a complexidade aromática, sem que a presença da madeira os marcasse em demasia, uma vez que ao aroma frutado se conjugaram os aromas a baunilha e boisé, entre outros. Apresentavam igualmente uma boa acidez e melhor volume de boca, essenciais para um vinho equilibrado. Pode ainda concluir-se que esta técnica precisa de ser melhor estudada, tanto a nível prático como teórico, uma vez que existe pouca bibliografia sobre vinho rosé e inexistente sobre vinho rosé fermentado e estagiado em contacto com madeira, que se demonstrou uma nova alternativa com potencialidades que devem ser exploradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRERA-GARCÍA, V., *et al.* (2007). Different sorption behaviors for wine polyphenols in contact with oak wood. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **55**: 7021-7027.
- BOULTON, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**: 67–87.
- CHATONNET, P., *et al.* (1992). Incidence des conditions de fermentation at d'èlevage des vins blanc secs en barriques sur leur composition in substances cèdées par le bois de chêne. *Science des Aliments*, **12**: 665-685.
- CIE, (1986). Colorimetry, 2nd Ed.- Publication CIE 15.2.Vienna.
- DEL BARRIO-GÁLAN, *et al.* (2011). Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: The effect of polysaccharides and the phenolic composition. *Food Chemistry*, **127**: 528-540.
- FAUVET, J. e GUITTARD, A. (1998) – La vinification en rosé. In: Flanzy, C. Oenologie, fondements scientifiques et technologiques, Ed. Tec & DOC.
- JORDÃO, A., *et al.* (2006). Effect of oak constituents and oxygen on the evolution of malvidin-3-glucoside and (+)-catechin in model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57**:377-381.
- JORDÃO, A.; *et al.* (2007). Ellagitannins from Portuguese oak wood (*Quercus pyrenaica* Willd.) used in cooperage: influence of geographical origin, coarseness of the grain and toasting level. *Holzforschung*, **61**:155-160.
- OIV (2013). Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts, Volume 1. OIV. Paris.
- PEREZ-PRIETO, L., *et al.* (2003). Oak-matured wines: influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**: 1445-1450.
- SOMERS, T. C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*. **10**: 2175-2186.
- SOMERS T. C. e EVANS, M. E. (1977). Spectral Evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **28**: 279-287.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL AROMÁTICO GLICOSÍDICO DE VIÑAS TRATADAS CON EXTRACTO DE ROBLE. INFLUENCIA EN EL AROMA DEL VINO

Kortes SERRANO DE LA HOZ¹; Ana I. PARDO-GARCÍA¹; Manuel CARMONA^{1,2}; Amaya ZALACAIN¹; Gonzalo L. ALONSO¹; M. Rosario SALINAS^{1*}

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que la aplicación de un extracto de roble a viñas de distintas variedades modifica la composición aromática de sus vinos, afectando también a las agliconas de los precursores aromáticos de las uvas. El análisis de estos precursores suele abordarse a través de la determinación pormenorizada de las agliconas volátiles mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (GC-MS), pero resulta un proceso complicado y trabajoso, mientras que el análisis de la glucosa glicosídica (glucosa G-G) liberada de estos precursores resulta más sencilla para determinar el potencial aromático de la uva. En este trabajo se evalúa el potencial aromático glicosídico, mediante el análisis de glucosa G-G de uvas Monastrell, cuyas viñas han recibido distintos tratamientos con extractos acuosos de roble. Se analizaron mediante SBSE-GC-MS los aromas de sus vinos y se sometieron a un análisis sensorial en tres momentos distintos (después de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y tras permanecer 6 meses en botella). Los resultados obtenidos muestran que la calidad aromática de la uva se correlaciona con los aromas encontrados en el vino, se propone por tanto como un índice más para evaluar la calidad en la uva.

Palabras clave: precursores aromáticos glicosídicos, potencial aromático, uvas tintas, extracto de roble.

1 - INTRODUCCIÓN

Entre todos los constituyentes del aroma de los vinos, los que provienen de la uva juegan un papel determinante en la calidad y tipicidad del vino. Diversos estudios han puesto

¹ Cátedra de Química Agrícola. E.T.S.I. Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. España, s/n, 02071, Albacete, España. *e-mail: Rosario.Salinas@uclm.es

² Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, 02071, Albacete, España.

de manifiesto que cuando se aplica un extracto acuoso de roble a la viña, los compuestos aromáticos del extracto son asimilados por la uva y están presentes en los vinos elaborados con ellas (MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2013). El conjunto de compuestos de la uva relacionados con el aroma responden a dos grupos de sustancias generadas en el metabolismo secundario, los aromas libres o moléculas olorosas, y los precursores del aroma o moléculas no olorosas pero que bajo determinadas condiciones, como durante el proceso de vinificación y a lo largo del envejecimiento, se pueden transformar en moléculas olorosas. En este último grupo predominan los precursores glicosilados, en los que la aglicona volátil está unida a una molécula de glucosa mediante un enlace O-glicosídico. Estos precursores son una fuente potencial del aroma ya que al romperse el enlace se produce la liberación de la aglicona volátil con el consecuente impacto en el aroma del vino. La medida de este potencial puede realizarse hidrolizando el enlace glicosídico por vía enzimática o por vía ácida, y midiendo la concentración bien de la aglicona o bien de la glucosa que se libera (glucosa G-G). Las agliconas tienen estructuras muy complejas y altamente diversas, pero pueden ser analizadas individualmente, una vez roto el enlace glicosídico, mediante métodos basados en la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GÜNATA *et al.*, 1985; IBARZ *et al.*, 2006; LOSCOS *et al.*, 2009). En este proceso de ruptura también se produce una proporción equimolecular de glucosa, por lo que la determinación de esta glucosa glicosídica (glucosa G-G) resulta más sencilla, permitiendo estimar la concentración total de los precursores glicosilados del aroma presentes en la muestra y por tanto el potencial aromático de la uva. Recientemente se ha desarrollado este método mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Índice de Refracción (HPLC-IR) (SALINAS *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo es conocer la relación entre la glucosa G-G de las uvas tratadas con extracto acuoso de roble y la calidad aromática de sus vinos. Para ello, se determina el potencial aromático glicosídico de esas uvas, mediante el análisis de la glucosa G-G liberada por hidrólisis ácida. Este potencial se relaciona con la composición aromática y con el análisis sensorial de sus vinos.

2 - MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto de roble

El extracto de roble utilizado lo proporcionó la empresa Protea France S.A.S. Es un extracto acuoso empleado como aditivo alimentario para bebidas espirituosas y zumos de frutas, lo que garantiza que no presenta riesgo de toxicidad.

Material vegetal y tratamientos realizados

Las uvas utilizadas fueron de la variedad Monastrell recogidas durante la cosecha de 2010, cultivadas en una parcela experimental de la BSI de Jumilla (D.O. Jumilla, Sureste de España). Se utilizaron dos formulaciones en agua del extracto de roble: al 25% y 100% que se aplicaron en una ocasión sobre las uvas (25%-1 y 100%-1), y la del 25% también se aplicó en cuatro ocasiones (25%-4) para alcanzar la del 100%. Los tratamientos se realizaron sobre toda la superficie foliar de las cepas a partir del inicio del envero cada uno sobre 16 plantas. Las uvas se recolectaron manualmente, en perfecto estado sanitario y una parte representativa se congeló a -18°C hasta el momento de su análisis.

Vinificación

Las uvas que no fueron congeladas se procesaron siguiendo el sistema tradicional de vinificación en tinto. De cada tratamiento se elaboraron 15 L de vino por duplicado en depósitos de acero inoxidable de 30 L. La fermentación alcohólica transcurrió a 22±1°C y se inocularon levaduras seleccionadas. Finalizada la fermentación alcohólica se trasegaron los vinos a recipientes de 5L y se inocularon bacterias para llevar a cabo la fermentación maloláctica y completar así la vinificación. Posteriormente los vinos se sulfitaron y se embotellaron para su conservación. Los vinos obtenidos fueron 25%-1, 25%-4, 100%-1 y control.

Análisis del potencial aromático glicosídico en uvas

Se determinó mediante el análisis de la glucosa glicosídica (glucosa G-G) liberada por hidrólisis ácida de los precursores aromáticos glicosídicos, valiéndonos de un HPLC provisto de un detector de índice de refracción siguiendo el método de SALINAS *et al*,

(2012). De cada muestra se prepararon dos extractos diferentes, sustituyendo las dos horas de maceración por una extracción con microondas, utilizando para ello un sistema de microondas NEOS. Posteriormente se siguieron las siguientes etapas: eliminación de los polifenoles glicosilados y aislamiento de los precursores glicosilados del aroma, eliminación de la glucosa libre, hidrólisis ácida de los precursores y análisis por HPLC-IR. Cada extracto se analizó por duplicado. Paralelamente, se realizó el mismo análisis para cada muestra añadiendo β -D-fenilglucosa (20 mM) como estándar interno, para establecer el factor de retención en el cartucho de extracción (FR).

Análisis de volátiles en los vinos

Se siguió el método de MARÍN *et al.* (2005), basado en la SBSE-GC-MS y el empleo de un twister de 10 mm x 0,5 mm. A 25 mL de vino se añadió 3-metil-1-pentanol como estándar interno y a continuación se realizó la absorción por inmersión del twister con agitación de 500 rpm durante 60 minutos y temperatura de 25°C. Los analitos desorbidos fueron transferidos al cromatógrafo de gases. Los volátiles se identificaron y cuantificaron usando rectas de calibrado de los patrones comerciales y utilizando la librería NIST del equipo analítico. El muestreo se llevó a cabo en tres momentos distintos: tras la fermentación alcohólica, al finalizar la fermentación maloláctica y después de 6 meses. Cada vino se analizó por duplicado, por lo que se obtuvieron 4 resultados por cada vino resultante del correspondiente tratamiento realizado en las viñas.

Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial descriptivo de los vinos en los distintos momentos de muestreo. El panel de cata lo formaron 8 jueces expertos, de ambos sexos. La ficha de cata incluyó los siguientes descriptores: intensidad olfativa, aromas fermentativos, varietales, frutales, frutas maduras, hierbas, madera/roble, clavo, cuero, vainilla, especiado y coco. Se puntuaron desde 1 (ausencia) hasta 7 (máxima intensidad).

3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método para la determinación de la glucosa G-G requiere el cálculo del factor de retención (FR) del patrón añadido, que es necesario para conocer el efecto de la matriz

en la retención en el cartucho de extracción de los precursores aromáticos glicosilados. En este caso, aunque la matriz de partida es la misma al ser uvas de la misma variedad, se obtuvo el FR para saber si existían diferencias entre las uvas por efecto de los tratamientos con extracto de roble (Tabla 1). Se observaron diferencias significativas en las uvas procedentes del tratamiento 100%-1, mientras que las uvas control, 25%-1 y 25%-4 mostraron una retención similar entre ellas, por lo que se tomó el valor medio de 1,46 para estas últimas y 1,57 para el 100%-1. La mayor retención de la muestra 100%-1 puede ser debida a su mayor contenido en antocianos (PARDO-GARCÍA *et al.*, 2013).

Tabla 1. Factores de retención (FR) de las distintas muestras de uva.

Tratamiento	Extracción	FR	FR _{medio}
control	1	1,45	1,47^c
	2	1,48	
25%-1	1	1,51	1,50^b
	2	1,50	
25%-4	1	1,44	1,42^{b,c}
	2	1,40	
100%-1	1	1,58	1,57^a
	2	1,57	

La Tabla 2 muestra el contenido de glucosa G-G de las dos extracciones diferentes realizadas en las uvas. Cabe destacar los bajos coeficientes de variación encontrados entre ambas (< 9%), lo que pone de manifiesto la representatividad del tamaño de la muestra (50 g. de uva).

Tabla 2. Concentración de precursores glicosilados de las distintas muestras de uva.

Tratamiento	Extracción	Glucosa G-G (mM)	Media G-G (mM)
control	1	1,65	1,60^c
	2	1,55	
25%-1	1	1,58	1,61^c
	2	1,64	
25%-4	1	1,77	1,71^b
	2	1,65	
100%-1	1	1,79	1,81^a
	2	1,82	

Los resultados muestran que las uvas procedentes de los tratamientos 25%-4 y 100%-1 tuvieron un mayor contenido en precursores glicosilados del aroma, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las uvas usadas como control y las del tratamiento 25%-1. Esto demuestra que la aplicación del extracto de roble a las cepas afecta a la composición aromática de la uva en su forma glicosilada, lo que está de acuerdo con anteriores trabajos en los que se estudiaban las agliconas volátiles (MARTÍNEZ-GIL *et al.*, 2013). Por otra parte, la aplicación a la cepa de la misma cantidad de extracto mediante la formulación 100%-1 o la formulación o 25%-4, influyó en el potencial aromático glicosídico, ya que se encontraron diferencias significativas entre ambos, siendo el tratamiento 100%-1 el de mayor valor. Esto demuestra que la distribución del extracto de roble también influye en el aroma varietal.

En la Tabla 3 se muestran los grupos aromáticos en los que se han clasificado los compuestos volátiles determinados en los vinos, para lo que se han considerado sus descriptores más usados en la bibliografía.

Tabla 3. Compuestos volátiles analizados mediante SBSE-GC-MS, grupo de clasificación, descriptor más común y umbral de percepción olfativa (UPO).

Grupo	Compuestos	Descriptor	UPO (µg/L)	Grupo	Compuestos	Descriptor	UPO (µg/L)
	4-Etilguayacol	Especiado	33		4-Etilfenol	Cuero, establo	440
	4-Vinilfenol	Medicinal	180		Isobutanol	Graso, amargo, verde	75000
	Cinamato de etilo*	Afrutado, floral	1.1		3-Metil-1-butanol	Fusel, alcohol	30000
	Dihidrocinamato de etilo*	Floral	1,6		Lactato de etilo	Lácteo, ácido	150000
	Nonanal	Verde	1		Decanoato de etilo	Jabón	500
	Linalol*	Floral, cítrico	15		Succinato de dietilo	Vinoso	1200
	Citronelol*	Cítrico	100		Acido hexanoico	Queso	3000
	Nerol*	Floral, cítrico	15		Acido octanoico	Queso	500
	Geraniol*	Floral, cítrico	30		Acido decanoico	Jabón	6000
	Geraniol acetona*	Floral	60		Butirato de etilo	Afrutado	20
	β-Ionona*	Violetas	5		Hexanoato de etilo	Afrutado	5
	Nerolidol*	Floral	15		Acetato de hexilo	Afrutado	670
	Farnesol c*	Floral	1000		Benzaldehído	Almendra amarga	2000
	β-Damasconona*	Ciruela, floral	0,05		Acetato de etilo	Afrutado, disolvente	7500
	Guayacol*	Humo, tostado	9,5		Octanoato de etilo	Jabón, dulce	580
	Eugenol*	Clavo	6		Acetato de isoamil	Plátano	1600
	Vanillato de etilo*	Vainilla	990		2-Feniletil alcohol	Rosa, floral	10000
	Siringol*	Humo	570		Acetato de 2-feniletilo	Afrutado, floral	250
Herbáceos	1-Hexanol	Hierba cortada	8000	Otros	Furfural	Almendra tostada	14100
	3-Hexen-1-ol (Z)	Hierba cortada	400		5-Metil-furfural	Almendra tostada	45000
					γ-Nonalactona	Coco, graso	30

Los compuestos identificados con * pueden proceder de precursores aromáticos glicosilados.

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de contribución de cada grupo de compuestos al aroma del vino tras permanecer seis meses en botella. La concentración mayoritaria en todas las muestras es la de los compuestos clasificados como aromas fermentativos (> 97%), mientras que los compuestos varietales apenas alcanzaron el 0,4% del total. Se

observó que en todos los casos, los tratamientos con extracto de roble aumentaron las concentraciones de compuestos fermentativos. En los vinos de los tratamientos 100%-1 y 25%-4 hubo un incremento importante de aromas varietales así como de furfural, 5-metil-furfural y g-nonalactona. También se observó una disminución en la concentración de aromas herbáceos frente al control. Por otra parte, teniendo en cuenta los umbrales de percepción olfativa (UPO) de los compuestos analizados y el porcentaje expresado como VA (valor de aroma), el impacto de los aromas varietales sobre el vino adquiere una importancia significativa (> 70%). El vino control manifestó el mayor valor en cuanto a aromas fermentativos, mientras que 100%-1 y 25%-4 fueron los de valores más bajos. Todos los vinos procedentes de las cepas tratadas con extractos de roble obtuvieron un mayor impacto aromático varietal que el control, siendo el 100%-1 el más elevado. De igual forma, las notas aromáticas herbáceas sufrieron una disminución en todos estos vinos respecto al control. En cuanto a los compuestos agrupados como “otros”, aumentaron de forma más evidente en los vinos 25%-4.

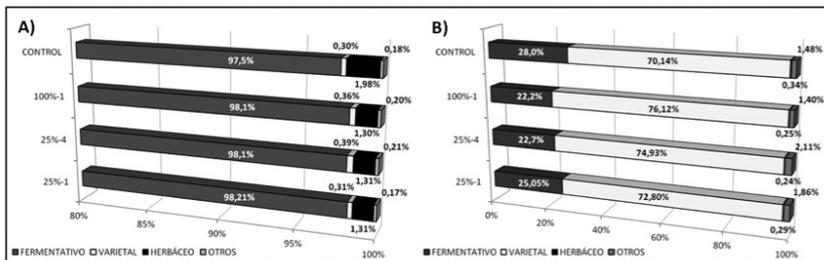


Figura 1. Porcentaje de volátiles de los vinos que han permanecido 6 meses en botella según el grupo de clasificación. A) Referido a concentración y B) Referido al valor de aroma (VA).

En la Figura 2 se muestra la relación entre la composición aromática de los vinos en cada momento de muestreo y el contenido de glucosa G-G de las uvas para cada tratamiento.

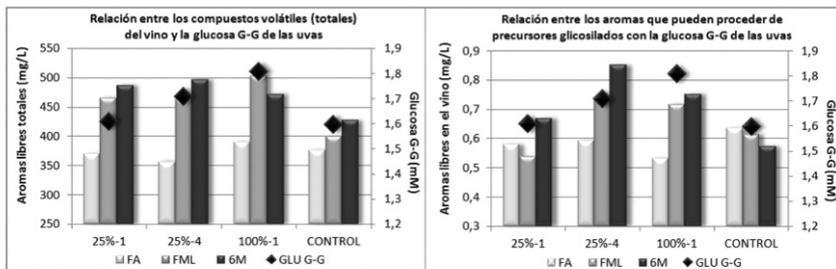


Figura 2. Relación entre la composición aromática de los vinos y la glucosa G-G de sus uvas. Se muestra la evolución en cada momento de muestreo: FA, fermentación alcohólica; FML, fermentación maloláctica; 6M, al cabo de 6 meses en botella.

Respecto al total de compuestos volátiles, se observa cómo todos los vinos procedentes de uvas que recibieron alguno de los tratamientos obtuvieron valores superiores al control tras la fermentación maloláctica. El mismo comportamiento se observa al relacionarlos con los aromas del grupo “varietales” que pueden proceder de precursores glicosilados (identificados en la Tabla 1), siendo mucho más acusado el aumento en los vinos 100%-1 y 25%-4 tras seis meses en botella. El mayor valor de potencial aromático glicosídico (glucosa G-G) correspondió a las uvas 100%-1, mientras que la mayor liberación de aromas en el vino se observó para la muestra 25%-4. Esto pone de manifiesto que el número de aplicaciones según la formulación empleada influye en la síntesis de los precursores glicosilados y en su posterior liberación.

El análisis sensorial confirma el análisis químico como se puede ver en la Figura 3. Destacamos que al cabo de 6 meses de la FML, respecto al control, los vinos procedentes de las cepas tratadas, tienen una mayor presencia de aromas a madera, hecho que atribuimos a la asimilación de la planta de los compuestos del extracto. Además, las puntuaciones para los descriptores “varietal”, “frutal” y “frutas maduras”, que son característicos de Monastrell, son mayores, por lo que se incrementa la tipicidad varietal.

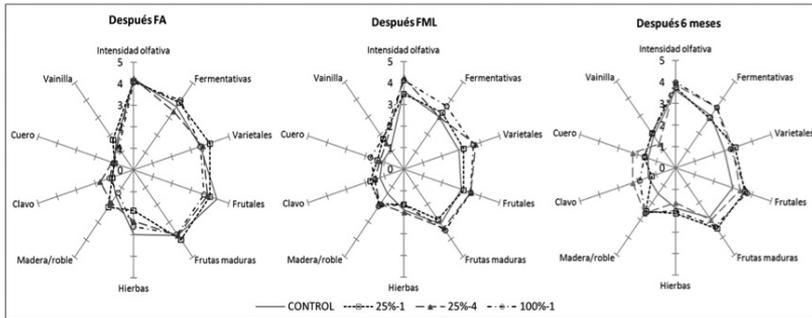


Figura 3. Análisis sensorial de los vinos en los tres momentos de muestreo (FA: después de la fermentación alcohólica; FML: después de la fermentación maloláctica; 6 meses: al cabo de seis meses en botella).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al MICINN la concesión del proyecto de ref.: AGL2009-08950 que ha permitido financiar en colaboración con fondos FEDER, Agradecemos a la empresa Protea France S.A.S. el suministro del extracto de roble y a la bodega BSI de Jumilla la disponibilidad de sus viñas e instalaciones para este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- GÜNATA, Z.; BAYONOVE, C.; BAUMES, R.; CORDONNIER, R. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A* **331**, 83-90.
- IBARZ, M.J.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; LOSCOS, N.; CACHO, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A* **1116** (1-2), 217-229.
- LOSCOS, N.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** (6), 2468-2480.
- MARÍN, J.; ZALACAIN, A.; DE MIGUEL, C.; ALONSO, G.L.; SALINAS, M.R. (2005). Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A* **1098**, 1-6.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; ANGENIEUX, M.; PARDO-GARCÍA, A.I.; ALONSO, G.L.; OJEDA, H.; SALINAS, M.R. (2013). Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines. *Food Chemistry* **138**, 956-965.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; GARDE-CERDÁN, T.; MARTÍNEZ, L.; ALONSO, G.L.; SALINAS, M.R. (2011). Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 3253-3263.
- MARTÍNEZ-GIL, A.M.; GARDE-CERDÁN, T.; ZALACAIN, A.; PARDO-GARCÍA, A.I.; SALINAS, M.R. (2012). Applications of an oak extract on Petit Verdot grapevines. Influence on grape and wine volatile compounds. *Food Chemistry* **132**, 1836-1845.
- PARDO-GARCÍA, A.I.; MARTÍNEZ-GIL, A.M.; CADAHÍA, E.; PARDO, F.; ALONSO, G.L.; SALINAS, M.R. (2013). Oak extract application to grapevines as a wine polyphenol bio-stimulant. *Enviado para su publicación*.
- SALINAS, M.R.; SERRANO DE LA HOZ, K.; ZALACAIN, A.; LARA, J.F.; GARDE-CERDÁN, T. (2012). Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification. *Talanta* **89**, 396-400.

MICROBIOMA DAS UVAS E FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE DIFERENTES REGIÕES VITIVINÍCOLAS PORTUGUESAS

Diogo PINHO¹; Cátia PINTO¹; Susana SOUSA¹; Miguel PINHEIRO¹ e Ana Catarina GOMES^{*1}

Resumo

A vinificação é um processo de transformação de alimentos que depende totalmente de uma complexa fermentação realizada por vários microrganismos que atuam sinergicamente. De fato, a diversidade microbiana, a qualidade e variedade da uva e as condições de fermentação são fatores críticos para o sabor e *bouquet* dos vinhos, conferindo assim a sua identidade. Revelar o microbioma complexo das uvas e dos mostos, a sua dinâmica e compreender os fatores ecológicos que explicam a biodiversidade, tem sido um desafio para a enologia.

Este trabalho apresenta o primeiro panorama completo das comunidades microbianas, caracterizando o microbioma natural presente nos mostos iniciais e durante as fermentações espontâneas. Considerando que a maioria dos microrganismos não é cultivável foi realizada uma abordagem metagenômica usando a plataforma GS 454 FLX Titanium para estudar de forma exaustiva a biodiversidade microbiana de seis regiões vinícolas portuguesas: Minho, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura e Alentejo.

Os nossos dados mostraram uma elevada biodiversidade, onde o microbioma da uva difere significativamente do microbioma das fermentações e as alterações na biodiversidade são mais significativas entre os fungos e leveduras. Curiosamente verificámos que as regiões vitivinícolas portuguesas têm comunidades microbianas naturalmente diferentes, que podem também contribuir para o *terroir* de alguns vinhos tradicionais.

Palavras-chave: Uva; Fermentação espontânea; Microbioma; *Terroir* microbiano; Metagenómica; Pirosequenciação

¹ Unidade de Genómica e Bioinformática, Biocant – Associação de Transferência de Tecnologia Parque Tecnológico de Cantanhede, Núcleo 04, Lote 3
3060-197 Cantanhede, Portugal
email: *acgomes@biocant.pt

1-INTRODUÇÃO

As uvas aportam um complexo microbioma, que inclui uma grande diversidade de fungos filamentosos, leveduras e bactérias com diferentes características fisiológicas e metabólicas, desempenhando um papel de destaque no processo de vinificação (PRETORIUS, 2000; FLEET, 2003; BARATA *et al.*, 2012).

A fermentação espontânea do vinho é realizada pelo microbioma indígena (HEARD, 1999; PRETORIUS, 2000; CIANI *et al.*, 2006; RENOUF *et al.*, 2007) tendo este um papel importante na fermentação. Contudo, a maioria dos estudos de microbiologia dos vinhos focam-se na caracterização de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, e não sobre o papel das comunidades microbianas, que continuam a ser pouco compreendidas (PRETORIUS, 2000; FLEET, 2008; NISIOTOU *et al.*, 2011). No entanto, a necessidade crescente de produzir vinhos com estilos únicos e desejáveis, associada à desmitificação do papel negativo das comunidades microbianas indígenas, relançou a discussão e a necessidade de melhor estudar estas comunidades microbianas e o seu potencial enquanto fonte de metabolitos únicos e distintos (HEARD, 1999; JOLLY *et al.*, 2006; FLEET, 2008).

Neste trabalho foi utilizada a sequenciação paralela massiva do ADN com o intuito de desvendar tanto os microrganismos cultiváveis como os não cultiváveis presentes nas uvas e durante as fermentações espontâneas de diferentes regiões vitivinícolas portuguesas. Tirando benefício da pirosequenciação, as comunidades bacterianas e fúngicas foram sequenciadas em simultâneo.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Colheita das uvas e fermentações espontâneas

As amostras de uvas foram recolhidas durante a vindima de 2010 de seis regiões portuguesas: Minho (Mi), Douro (Dr), Dão (D), Bairrada (B), Estremadura (E) and Alentejo (Al). Um total de 17 amostras de uvas foram colhidas, esmagadas e a fermentação foi realizada no laboratório sob condições assépticas. Para cada amostra foi analisado o microbioma em 3 pontos temporais distintos: uvas ou mosto inicial (MI), início da fermentação (IF) e final da fermentação (FF).

2.2-Extração do ADN, construção das bibliotecas de ADN e pirosequenciação

O ADN total de 51 amostras foi extraído usando um protocolo proprietário de extração de ADN de mostos, e a biblioteca de ADN foi construída para cada amostra individualmente. Todas as reações de PCR foram realizadas em 30 μL , e cada mistura de reação continha 2 μL de ADN total, 1,5 unidades de FastStart High Fidelity Taq DNA polymerase (Roche, USA), 1x tampão de reação com MgCl_2 (1.8 mM) incorporado (Roche, USA), 0,2 mM de dNTPs (Bioron, Germany) e 0,8 μM dos *primers* para a região V6 e 0,4 μM dos *primers* para as regiões D2 e ITS2. Para as bactérias, as condições de amplificação consistiam num passo de desnaturação inicial a 94°C (5min.), seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C (35s), hibridação a 50°C (35s) e extensão a 72°C (40s) e por fim um passo de extensão final a 72°C (5min). As condições de amplificação usadas para os fungos e leveduras foram as mesmas, mas o PCR foi realizado com 25 ciclos. As amostras foram misturadas de acordo com o número de moléculas de ADN, em concentrações equimolares e submetidas para pirosequenciação usando a plataforma GS FLX Titanium (454 Life Sciences, Roche, USA) do Biocant (Cantanhede, Portugal).

2.3-Processamento dos dados da pirosequenciação e análise estatística

As sequências obtidas foram tratadas com uma *pipeline* de anotação automática implementada na Unidade de Bioinformática do Biocant. As diferenças da biodiversidade (Chao1) entre as amostras MI, IF e FF foram avaliadas através de ANOVA usando SPSS 20.0 (IBM, USA). Na comparação da estrutura da comunidade microbiana foi realizada uma Análise por Componentes Principais (PCA) usando o Bionumerics 6.5 (Applied Maths NV, Belgium).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Diversidade e riqueza das comunidades microbianas

As fermentações espontâneas analisadas revelaram possuir uma população de microorganismos bastante mais heterogênea, diversa e rica quando comparada com trabalhos anteriormente publicados, tendo-se também identificado microorganismos anteriormente não associados à fermentação de vinhos, em particular um conjunto significativo de microorganismos não cultiváveis.

Da sequenciação massiva das regiões V6, ITS2 e D2 das amostras MI, IF e FF provenientes de diferentes regiões vitivinícolas obteve-se um total de 1.160.482 sequências com elevada qualidade, que foram agrupadas de acordo com a sua semelhança filogenética. Assim, todas as sequências que apresentassem semelhanças entre si superiores a 97% foram agrupadas em Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs). Em média, a amostras de uva analisadas apresentaram uma biodiversidade de procariotas e de eucariotas de 78 e 70 espécies, respetivamente. No entanto, e como esperado, esta biodiversidade diminui drasticamente durante o processo fermentativo, sendo que o número de espécies de fungos e leveduras registado foi de 33 no início de fermentação e de 20 no final de fermentação. Relativamente à população bacteriana, observou-se um decréscimo na biodiversidade logo no início de fermentação que depois se manteve, tendo sido detetadas 56 potenciais espécies tanto em início como no final da fermentação.

Analisando a dinâmica da população microbiana ao nível do filo, as variações na biodiversidade corroboram a existência de uma forte modulação das fermentações espontâneas sobre a diversidade fúngica, sendo esta menor na comunidade de bactérias, uma vez que se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) para os filós Ascomycota e Basidiomycota e não para o filós Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Notavelmente, uma maior biodiversidade foi observada para as bactérias comparativamente com a população de fungos. Entre as duas regiões eucarióticas, a sequenciação da região D2 apresentou uma maior biodiversidade, quando comparada com a região ITS2.

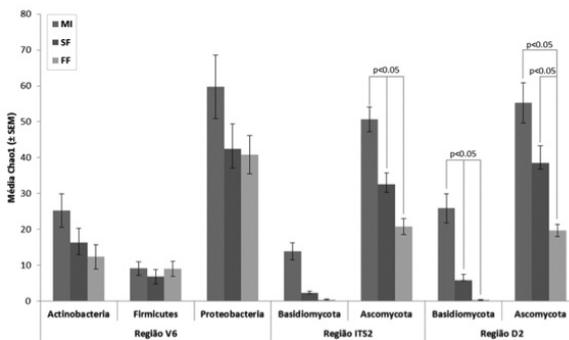


Figura 1: Dinâmica da biodiversidade associada às regiões V6, ITS2 e D2 ao nível do filo.

3.2-Comunidade Microbiana da Uva

As amostras de uvas apresentaram uma elevada diversidade microbiana, derivada da vinha nomeadamente, da filosfera e do meio ambiente (PRETORIUS *et al.*, 1999; RENOUF *et al.*, 2007; MILLS *et al.*, 2008; MARTINS, 2012; PINTO *et al.*, Submetido).

A população eucariota das uvas é caracterizada por fungos ubíquos como *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Ramularia*, *Lewia*, *Filobasidiella*, *Leptosphaerulina* e *Schizosaccharomyces*, assim como famílias bacterianas: *Halomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Oxalobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Shingomonadaceae*, *Nocardioideaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Methylobacteriaceae*.

Como esperado, a população de *Saccharomyces* estava presente em baixas quantidades, uma vez que esta população apresenta níveis bastante reduzidos ou até mesmo ausentes nas uvas e nas folhas da videira (PRETORIUS *ET AL.*, 1999; WESTHUIZEN *et al.*, 2000; JOLLY *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, Submetido). Adicionalmente, fungos filamentosos foram identificados nas uvas, tal como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium* ou *Rhizopus*, que são indesejáveis uma vez que afetam a qualidade do vinho. *Aspergillus niger*, *Penicillium glabrum* e *P. brevicompactum* foram identificados em todas as regiões e a sua presença no vinho deve ser evitada uma vez que estes são produtores de Ocratoxina A (TOIT e PRETORIUS, 2000).

Curiosamente, amostras com uma maior abundância de fitopatógenos (*Botryosphaeria dothidea* e *Erysiphe necator*) também apresentaram uma maior prevalência de microorganismos fitoprotetores (*A. pullulans* e *Rhodotorula*), verificando-se desta forma uma correlação direta entre dois grupos fúngicos. Foram ainda detetadas nas uvas bactérias ácido-lácticas (LAB) e bactérias ácido-acéticas (AAB), embora em baixas quantidades, indicando assim que as próprias uvas são fontes de contaminação dos mostos.

3.3-Microbioma das fermentações espontâneas de diferentes regiões vitivinícolas

De forma a perceber a variação espacial das populações, o microbioma dos mostos e dos estados de fermentação foram correlacionados com as diferentes regiões de Denominação de Origem Controlada (Figura 2). De acordo com cada região, o *Aureobasidium* foi o fungo dominante nas uvas com exceção do Alentejo, onde se verificou uma predo-

minância de *Lachancea*. As amostras de uva provenientes da Bairrada, Dão e Minho são caracterizadas por *Hanseniaspora*, *Hyphopichia* e *Botryotinia*, respetivamente, enquanto a *Rhodotorula* caracteriza as amostras do Douro e Minho.

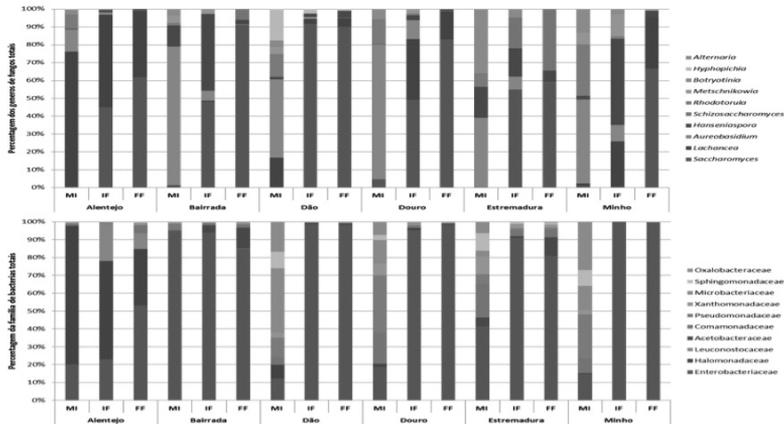


Figura 2: Abundância relativa dos 10 microrganismos eucariotas (superior) e procariotas (inferior) ao longo do MI, IF e FF das diferentes regiões portuguesas.

A comunidade bacteriana identificada foi bastante distinta ao longo das diferentes regiões, sendo o Alentejo e Bairrada as regiões cujas fermentações apresentaram perfis bacterianos mais distintos: enquanto a fermentação da Bairrada foi dominada por *Enterobacteriaceae*, as fermentações do Alentejo foram dominadas por *Halomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Estas famílias foram também identificadas no Dão, Douro, Estremadura e Minho, embora se verificarem abundâncias relativas inferiores e variáveis entre estas regiões. As amostras provenientes do Dão, Douro e Minho tiveram uma população bacteriana similar, caracterizada por *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Oxalobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Estas famílias foram também encontradas na Estremadura mas a níveis de abundância inferiores.

No que diz respeito à população de fungos e leveduras do início da fermentação, a população de *Saccharomyces* aumentou em todas as regiões, como esperado. De notar ainda que no início de fermentação a região do Alentejo apresentou um maior abundância de

Lachancea e o Minho foi principalmente caracterizado por *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Metschnikowia* e *Aureobasidium*. Também foram identificadas leveduras vínicas como *Metschnikowia*, *Torulaspota*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Issatchenkia* e com menor frequência *Pichia*. Contudo, as suas abundâncias relativas variaram de acordo com a região de origem, e de fato cada DOC apresentou no início de fermentação um *terroir* microbiano característico e único, com diferentes abundâncias destas leveduras e padrões específicos de modulação microbiana.

Finalmente, os finais de fermentação do Alentejo, Douro e Minho apresentaram uma composição similar entre si (*Saccharomyces* e *Lachancea*), enquanto a Bairrada e Dão foram maioritariamente caracterizadas por *Saccharomyces* (> 90%). A região da Estremadura continha *Saccharomyces*, assim como *Schizosaccharomyces*, em elevadas quantidades.

As amostras IF e FF não apresentaram grandes diferenças nos perfis bacterianos, sendo a família *Enterobacteriaceae* ubíqua e bastante abundante em todas as regiões. Nas regiões do Dão, Douro e Minho esta família bacteriana esteve presente em níveis elevados, e um grande número de sequências pertencentes à família *Acetobacteriaceae* foi observado nas regiões da Bairrada e Estremadura. A região do Alentejo apresentou um microbioma único, onde as famílias *Halomonadaceae* e *Leuconostocaceae* estavam presentes em baixas quantidades.

É interessante notar que as amostras com elevadas quantidades de *S. cerevisiae* no final da fermentação apresentaram baixos níveis de bactérias lácticas (LAB), nomeadamente *Leuconostoc* e *Weisella*, sugerindo que esta levedura exerce pressão sobre as LAB.

Na análise da dinâmica e relações entre as comunidades microbianas das diferentes regiões portuguesas usando PCA, verificou-se uma clara separação entre as amostras de uva e as amostras do processo de fermentação, estando as amostras de início de fermentação (IF) distribuídas entre as amostras uvas/mosto inicial e as de final de fermentação (FF). Esta separação deve-se principalmente à presença de *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Lachancea* e outros microrganismos ambientais no MI e *Saccharomyces* e *Enterobacteriaceae* nos pontos de fermentação (SF e EF).

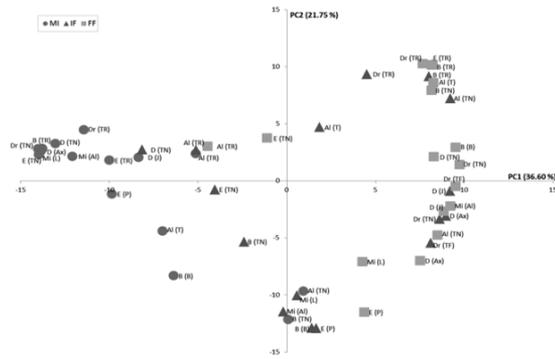


Figura 3: Análise por Componentes Principais da comunidade microbiana ao longo do MI, IF e FF para as diferentes regiões vinícolas portuguesas, baseado no número de seqüências.

4-CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstrou-se que o microbioma das uvas e das fermentações é distinto entre as 8 regiões vitivinícolas portuguesas estudadas, pelo que se conclui que o microbioma deve ser também considerado como um fator adicional de singularidade e variabilidade entre os vinhos e as regiões vinícolas. Este achado reforça a necessidade de desvendar a microflora natural destas regiões e explorar sua população microbiana natural, assim como estudar o seu impacto e potencial na produção de vinhos com estilos únicos, diferenciados e inovadores.

5- AGRADECIMENTOS

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projecto FCOMP-01-124-FEDER-008749).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153: 243-259.
- Ciani M, Beco L, Comitini F (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multi-starter wine yeast fermentation, *International Journal of food microbiology*. *Int J Food Microbiol* 108: 239-245.
- Fleet GH (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 11-22.
- Fleet GH (2008). Wine yeasts for the future. *Fems Yeast Res* 8: 979-995.
- Heard G (1999). Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Aust* 51: 347-352.
- Jolly N, Augustyns O, Pretorius I (2003). The effect of non-Saccharomyces on fermentation and wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 24: 55-62.
- Jolly N, Augustyn O, Pretorius I (2006). The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic* 27: 15-39.
- Martins GM (2012). Communautés microbiennes de la baie de raisin: Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. PhD thesis, Université de Bordeaux, Bordeaux.
- Mills D, Phister T, Neeley E, Johannsen E (2008). Wine Fermentation. In: Cocolin L, Ercolini D (eds). *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Springer: New York, USA. pp 162-192.
- Nisiotou AA, Rantsiou K, Iliopoulos V, Cocolin L, Nychas G-JE (2011). Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *Int J Food Microbiol* 145: 432-436.
- Pinto C, Barroso C, Pinheiro M, Egas C, Sousa S, Gomes A (Submetido). Unravelling the diversity of grapevine microbiome.
- Pretorius I, Westhuizen TJvd, Augustyn O (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South Africa wine industry. A review. *S Afr J Enol Vitic* 20: 61-74.
- Pretorius IS (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biot* 75: 149-164.
- Toit M, Pretorius I (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *S Afr J Enol Vitic* 21: 74-96.
- Westhuizen TJ, Augustyn OPH, Pretorius IS (2000). Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. *S Afr J Enol Vitic* 21: 3-9.

ENOKIT: SISTEMA MOLECULAR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NO VINHO

Susana SOUSA¹ e Ana Catarina GOMES^{1*}

RESUMO

O processo de fermentação de mostos v\u00ednicos envolve um conjunto alargado de microrganismos que contribuem para as propriedades organol\u00e9ticas do produto final. No entanto, a qualidade final do vinho pode ser comprometida devido \u00e0 presen\u00e7a de microrganismos indesejados que produzem metabolitos que conferem caracter\u00edsticas e aromas desagrad\u00e1veis.

Neste trabalho desenvolvemos um sistema molecular para dete\u00e7\u00e3o r\u00e1pida, eficaz e simult\u00e2nea de 41 microrganismos de interesse enol\u00f3gico, em menos de 48 horas. Esta dete\u00e7\u00e3o pode ser feita em qualquer etapa do processo de produ\u00e7\u00e3o, desde o mosto inicial at\u00e9 ao vinho engarrafado, assim como na monitoriza\u00e7\u00e3o de \u00e1guas de lavagem utilizadas nas adegas. Para tal, foi otimizado um protocolo para extra\u00e7\u00e3o de ADN a partir de mostos e vinhos e foram desenhados *primers* espec\u00edficos para dete\u00e7\u00e3o molecular destas esp\u00e9cies por PCR. Paralelamente, desenvolvemos um protocolo de dete\u00e7\u00e3o de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e *Zygosaccharomyces spp.* baseado em PCR quantitativo, que permite detetar e quantificar estes microrganismos em 48h.

O ENOKIT demonstrou ser uma ferramenta \u00fasil e fi\u00e1vel, sendo adequado para monitoriza\u00e7\u00e3o da popula\u00e7\u00e3o microbiana ao longo das fermenta\u00e7\u00f5es, bem como, para dete\u00e7\u00e3o e identifica\u00e7\u00e3o de microrganismos *spoilage* que podem levar a perdas de produ\u00e7\u00e3o com elevado impacto econ\u00f3mico.

Palavras-chave: Kit de identifica\u00e7\u00e3o molecular; Microrganismos *spoilage*; Dete\u00e7\u00e3o e quantifica\u00e7\u00e3o de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e *Zygosaccharomyces spp.*

1-INTRODU\u00c7\u00c3O

A fermenta\u00e7\u00e3o de mostos v\u00ednicos ocorre de forma espont\u00e2nea ap\u00f3s o esmagamento das uvas, em que os a\u00e7\u00facares passam a estar dispon\u00edveis para serem metabolizados por leveduras e bact\u00e9rias. Nas fases iniciais da fermenta\u00e7\u00e3o, as leveduras mais abundantes s\u00e3o

¹ Unidade de Gen\u00f3mica, Biocant – Associa\u00e7\u00e3o de Transfer\u00eancia de Tecnologia
Parque Tecnol\u00f3gico de Cantanhede, N\u00facleo 04, Lote 3,
3060-197 Cantanhede, Portugal
email:*acgomes@biocant.pt

a *Hanseniaspora uvarum* e *Candida stellata* (FUGELSANG e EDWARDS, 2007) e ainda algumas das espécies pertencentes aos géneros *Metschnikowia* e *Pichia*. Estas leveduras não-*Saccharomyces* são maioritariamente responsáveis pelo despoletar da fermentação alcoólica (FLEET, 2003). No entanto, a população microbiana altera-se com o avançar da fermentação, devido ao aumento da percentagem de etanol que causa um aumento significativo de *stress* fermentativo. Nesta fase, as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes ao etanol, dominam a fermentação e são responsáveis pelo seu término (SCHULLER *et al*, 2006).

Quando os açúcares provenientes do mosto são totalmente metabolizados, a concentração de leveduras decresce e a fermentação maloláctica é então desencadeada por uma série de bactérias, principalmente a *Oenococcus oeni*. Estas bactérias contribuem para a desacidificação de vinhos com pH mais baixo, tornando-os mais agradáveis ao paladar (LIU, 2001) e também para a estabilização microbiana do vinho, removendo nutrientes residuais e algumas toxinas bacterianas (FLEET, 2003).

Considerando que na produção de vinho é crítica a dinâmica do consórcio microbiano, existe uma necessidade constante de controlar e assegurar a sua qualidade e estado de conservação. Assim, é importante evitar a contaminação por microrganismos indesejáveis como as *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e as *Zygosaccharomyces spp.*

As bactérias *spoilage* mais comuns são alguns *Lactobacillus* nomeadamente, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* (BENEDUCE *et al*, 2004), *Lactobacillus hilgardii* (LONVAUD-FUNEL *et al*, 1999), *Pediococcus damnosus* (BENEDUCE *et al*, 2004), algumas *Acetobacter* nomeadamente, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* (BARTOWSKI *et al*, 2003), e *Glucanobacter oxydans* (SOKOLLEK *et al*, 1998).

Os fungos filamentosos têm igualmente um papel importante na qualidade final do vinho. Diversos fungos podem contaminar as uvas ainda na vinha e, esta contaminação poderá persistir durante a produção do vinho. Destes microrganismos serve de exemplo a *Botrytis cinerea* e alguns *Aspergillus*. O crescimento destes fungos nas uvas disponibiliza condições favoráveis para o crescimento de bactérias ácido-acéticas que produzem ácido acético e outras substâncias que retardam o crescimento das leveduras durante a fermentação, e ainda para o crescimento de bactérias produtoras de aminas biogénicas.

Para além disso, alguns destes fungos produzem micotoxinas, como a Ocratoxina A, produzida por algumas espécies de microrganismos pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que permanecem no vinho e são ingeridas pelo consumidor final (FLEET, 2003).

O crescimento de microrganismos indesejados durante as diferentes fases da vinificação pode levar à diminuição da qualidade e aceitabilidade do vinho, devido à produção de acidez volátil, sabores desagradáveis e turbidez conferida pela presença de polissacarídeos (SPONHOLZ, 1993). Para o produtor, a monitorização das alterações microbianas que ocorrem durante o processo de vinificação é importante por várias razões: para monitorizar as leveduras durante a fermentação alcoólica, para verificar o crescimento das bactérias durante a conversão maloláctica e, finalmente para assegurar a estabilidade do vinho antes do engarrafamento e armazenamento (DELFINI e FORMICA, 2001).

Muitos microrganismos enológicos têm sido identificados com base em métodos tradicionais que envolvem técnicas de microbiologia clássica. No entanto, estes métodos possuem limitações quer ao nível da deteção de microrganismos (não cultiváveis) quer em termos de rapidez. Deste modo, as tecnologias de Biologia Molecular aparecem como uma ferramenta útil na deteção e identificação de microrganismos de forma rápida e eficiente em qualquer fase do processo de produção do vinho.

O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento de um sistema de diagnóstico molecular que permita a deteção eficiente em tempo útil de um vasto leque de microrganismos enológicos.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Extração de ADN total de Mostos/Vinhos

Para extração do ADN total, recolheram-se as células de 3mL de mosto/vinho por centrifugação seguindo-se uma lavagem do *pellet* com água estéril. Para a extração do ADN, desenvolvemos e otimizamos um protocolo proprietário específico para a matriz vinho e mosto. A qualidade do ADN extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0.7%.

2.2-Seleção de *primers* específicos

Com base na literatura, foram selecionados 41 microrganismos:

<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Brett/Dekkera anomala</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Brett/Dekkera bruxellensis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Glucanobacter oxydans</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Issatchenkia terricola</i>	<i>Saccharomyces pasteurianus</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
<i>Candida cantarelli</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Candida vanderwaltii</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Candida vini</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Aspergillus tubigenensis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	

A partir da base de dados Genbank do NCBI, obtiveram-se as sequências dos diversos genes utilizados no desenvolvimento dos *primers* e posteriormente, foi utilizado o *software* BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*) que permitiu efetuar os alinhamentos das sequências genéticas das diferentes espécies e identificar zonas adequadas para a seleção de *primers*. Finalmente, efetuou-se um BLAST na base de dados do NCBI para verificar a especificidade dos *primers*. Assim, foi obtido um par de *primers* específico para cada uma das espécies incluídas no ENOKIT.

Todos os *primers* foram desenhados de modo a possuírem a mesma temperatura de ligação ao ADN genómico da respetiva espécie. Desta forma, numa única experiência é possível detetar simultaneamente qualquer uma das espécies incluídas no kit.

2.3-Teste de especificidade dos *primers*

Todos os *primers* específicos foram testados utilizando estirpes de referência ou estirpes identificadas no laboratório por sequenciação de *Sanger*.

As reações de PCR foram preparadas num volume de 25µL contendo, 1µL de ADN alvo (100ng/µL), 0.2µM de cada *primer*, 0.2mM de cada dNTP, 1.7mM de MgCl₂ e tampão de PCR *incomplete* 1x (Bioron). Para cada reação foram utilizadas 1.25U de enzima taq DNA polimerase (Bioron). As amostras foram amplificadas usando o termociclador Mastercycler® pro da *Eppendorf* nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 5min a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação durante 1min a 95°C, ligação dos *primers* durante 40s a 52°C e extensão durante 1min a 72°C, com uma extensão final de

10min a 72°C. Finalmente, 3µL do produto final de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% ou por eletroforese capilar no *HT DNA Labchip* da *Caliper LifeSciences*, para verificar o amplicão correspondente à espécie em questão.

2.4-Teste de sensibilidade dos *primers*

A sensibilidade de detecção do kit de diagnóstico foi determinada inoculando quantidades sucessivas de uma cultura pura de cada espécie (25000, 2500, 250 e 25 células/mL) num mosto em que esta não existia. De seguida, procedeu-se à extração do ADN total das diferentes amostras de mosto e à amplificação por PCR sob as condições anteriormente descritas e usando os *primers* específicos para a espécie inoculada.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Teste de especificidade dos *primers*

Neste trabalho foram desenhados pares de *primers* específicos para cada uma das espécies selecionadas, cuja especificidade foi testada contra o ADN da própria espécie, extraído a partir de microrganismos de referência depositados na DSMZ (coleção germânica de microrganismos e culturas celulares). Verificou-se que para todos os *primers* o tamanho do produto de amplificação obtido por PCR correspondia ao esperado e não existiam amplificações não específicas com as restantes espécies, como se verifica no exemplo da Figura 1.

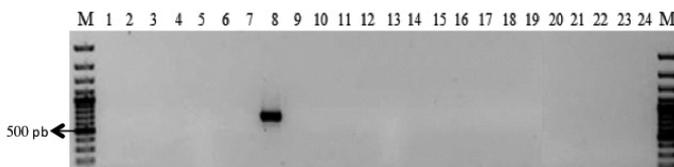


Figura 1: Teste de especificidade dos *primers* de *Kluyveromyces marxianus*. Foram utilizados os ADNs das seguintes espécies: 1- *C. cantarelii*, 2- *C. stellata*, 3- *C. vanderwaltii*, 4- *D. hansenii*, 5- *H. uvarum*, 6- *I. orientalis*, 7- *I. terricola*, 8- *K. marxianus*, 9- *K. thermotolerans*, 10- *L. elongisporus*, 11- *P. anomala*, 12- *P. guilliermondii*, 13- *P. membranifaciens*, 14- *S. bayanus*, 15- *S. cerevisiae*, 16- *S. paradoxus*, 17- *S. pasteurianus*, 18- *S. ludwigii*, 19- *S. pombe*, 20- *T. delbrueckii*, 21- *Z. bailii*, 22- *Z. bisporus*, 23- *Z. rouxii*, 24- C-.

3.2-Teste de sensibilidade dos primers

Para determinar o limite de sensibilidade de deteção do kit inocularam-se quantidades conhecidas de células quer de leveduras quer de bactérias em amostras de mosto esterilizado, por forma a obter mostos com concentrações crescentes de microrganismos, entre 25 e 25000 células/mL. O ADN total de cada mosto foi extraído e utilizado para deteção da espécie inoculada por PCR. Em todas as condições testadas, obtiveram-se sempre amplificações nos mostos inoculados com 25 células/mL, pelo que este foi considerado como sendo o limite de deteção, demonstrando-se assim a extrema sensibilidade do ENOKIT.

3.3-Validação do kit

Com o objetivo de validar o ENOKIT, recolheram-se várias amostras de mosto, vinho e águas de lavagem, num total de 24 amostras, que foram posteriormente analisadas. O produto resultante da amplificação foi visualizado por eletroforese. Na globalidade das amostras foram detetados microrganismos pertencentes a 15 espécies nomeadamente, *A. aceti*, *G. oxydans*, *O. oeni*, *C. cantarelli*, *C. vanderwaltii*, *D. hansenii*, *H. uvarum*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* e *Z. bisporus*.

Verificamos que o kit permite a deteção e identificação simultânea de diferentes espécies presentes em amostras reais e, portanto, pode ser aplicado com sucesso na monitorização da microflora vínica e deteção de microrganismos *spoilage* durante o processo de produção de vinho.

3.4-Identificação e quantificação de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e *Zygosaccharomyces spp.*

O ENOKIT permite ainda uma quantificação de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e *Zygosaccharomyces spp*, obtida através de PCR quantitativo em tempo real. Na figura 2 apresenta-se o resultado da análise de um vinho quanto à presença de *Zygosaccharomyces* e verificou-se que a amostra possui apenas ADN da levedura *Zygosaccharomyces rouxii*.

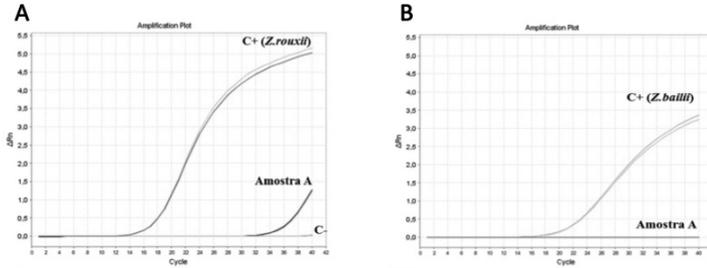


Figura 2: A) Identificação de *Zygosaccharomyces rouxii* numa amostra de vinho utilizando os *primers* específicos desta espécie; B) Identificação de *Zygosaccharomyces bailii* numa amostra de vinho utilizando os *primers* específicos desta espécie.

Para a *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* foi desenvolvido um protocolo para quantificação relativa e absoluta por PCR em tempo real. Na Figura 3 foram analisados três vinhos quanto à presença e quantificação relativa de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e conseguimos ver que na amostra 1 foi detetado mais ADN da referida espécie do que nas amostras 2 e 3.

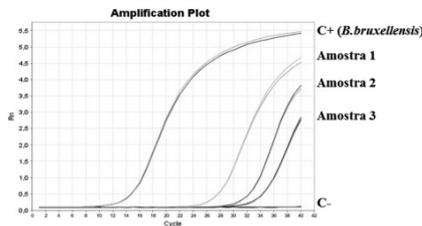


Figura 3. Identificação e quantificação relativa de *Brettanomyces bruxellensis* em 3 amostras de vinho utilizando os *primers* específicos desta espécie.

Para quantificação absoluta de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* (Figura 4A) inocularam-se diferentes quantidades de uma cultura pura deste microrganismo (2500, 1250, 250, 125 e 25 células/mL) num vinho filtrado para elaboração de uma reta padrão (Figura 4B). Procedeu-se à extração de ADN das amostras com diferentes quantidades de células inoculadas com posterior amplificação por PCR em tempo real. Assim, foi possível determinar que a concentração *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* na amostra 1 foi de 185 células/mL.

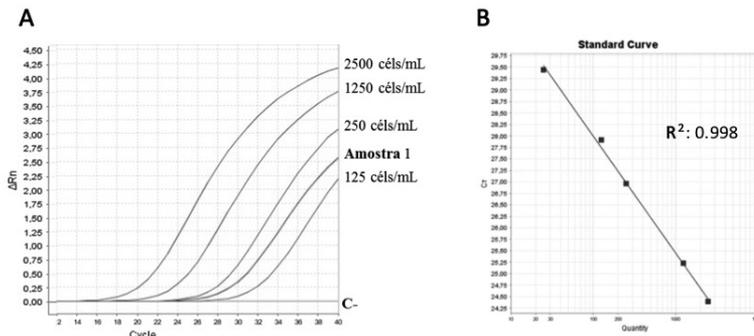


Figura 4: A) Identificação e quantificação absoluta de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* numa amostra de vinho utilizando os *primers* específicos desta espécie. B) Reta padrão elaborada com 2500, 1250, 250, 125 e 25 células/mL de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*.

4 - CONCLUSÃO

O ENOKIT, baseado em técnicas de biologia molecular, pode ser aplicado a amostras de qualquer etapa do processo de produção de vinhos: uvas, mosto, vinho, utensílios utilizados durante a produção, reservatórios de estágio ou envelhecimento, águas de lavagem utilizadas nas adegas, entre outros. Este kit, ao permitir a deteção simultânea, rápida e eficiente de 41 microrganismos de interesse enológico em menos de 48 horas, disponibiliza uma solução eficaz para o controlo microbiológico durante a produção do vinho.

Neste trabalho desenvolvemos ainda uma metodologia para identificação e quantificação relativa de *Zygosaccharomyces rouxii* e *Zygosaccharomyces bailii*, e quantificação absoluta de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. A deteção destes microrganismos *spoilage* é fundamental para a qualidade final do vinho sendo que este tipo de metodologia permite exatamente fazer este tipo de deteção em tempo útil.

5 - AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto InovWine financiado pelo FEDER, através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE, e “Quadro de Referência Estratégico Nacional” – QREN, com a referência FCOMP-01-0202-FEDER-011498.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTOWSKY J, Xia, D, Gibson, L, Fleet, H, Henschke, A (2003). Spoilage of bottles red wine by acetic bacteria. *Lett Appl Microbiol* 36: 307-314.
- BENEDUCE L, Spano G, Vernile A, Tarantino D, Massa S (2004). Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J Appl Microbiol* 44(1): 10-16.
- DELFINI C, Formica V (2001). *Wine Microbiology: Science and Technology*. 1th edition. Marcel Dekker, New York, USA.
- FLEET G (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 86(1-2): 11-22
- FUGELSANG C, Edwards G (2007). *Wine Microbiology: Pratical applications and procedures*. 2th edition Springer, New York, USA.
- LIU Q (2001). A Review: Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J Appl Microbiol*. 92(4): 589–601.
- LONVAUD-FUNEL A (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76: 317-331.
- SHULLER D, Casal M (2006). The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91(2): 137–150.
- SOKOLLEK J, Hertel C, Hammes P (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J Biotechn*. 60: 185-206.
- SPONHOLZ R (1993). Wine Spoilage by Microorganisms. In: “*Wine Microbiology and Biotechnology*”. Ed. Fleet, H. Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland. 14: 395–420.

PRODUCCIÓN DE LEVADURAS NO-*Saccharomyces* PARA VINIFICACIÓN

Manuel RAMÍREZ ^{1*}, Matilde MAQUEDA ¹, Alexis GILLET ³, Bruno MARCHESI ³, Rocío VELÁZQUEZ ¹, José A. REGODÓN ¹

RESUMEN

Se analiza la producción de nuevas estirpes vnicas de levaduras *Torulaspóra* con distintos medios de cultivo, y se comparan los resultados con los correspondientes a levaduras comerciales de referencia. El número de células viables antes y después del secado fue mayor en Melaza 1X que en YEPD. Al incrementar la concentración de nutrientes en el medio de melazas, Melaza 2X, el rendimiento en producción y la viabilidad celular antes y después del secado disminuyeron considerablemente. La producción de levaduras *Saccharomyces* fue mayor que la de *Torulaspóra* en cultivos con tiempos de incubación cortos (2 días), como se suele proceder en la industria. Tiempos de incubación largos (8 días) mejoraron el rendimiento de los cultivos de *Torulaspóra*, superando a *Saccharomyces* tanto en YEPD como en Melaza 1X, aunque siempre se apreció mayor proporción de células muertas (o en estado sub-lethal) en *Torulaspóra* que en *Saccharomyces*.

Palabras clave: levaduras vnicas, producción, vino, melaza, *Saccharomyces*, *Torulaspóra*.

1 - INTRODUCCIÓN

Las vinificaciones industriales se suelen realizar en la mayoría de las regiones vinícolas del mundo con inóculos de levaduras vnicas seleccionadas del genero *Saccharomyces* (Fleet and Heard, 1993; Ribèreau-Gayon, 1985; Suárez, 1990). Teóricamente, la levadura añadida al mosto domina durante la fermentación alcohólica sobre las levaduras silvestres y es la que más aporta a los aromas secundarios producidos durante la fermentación (Fleet and Heard, 1993), aunque no se puede descartar la contribución de las distintas levaduras silvestre al sabor y aroma de los vinos. Los compuestos producidos por las

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz (Spain). mramirez@unex.es.

³ IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne BP 17867 21078 DIJON CEDEX (France).

levaduras durante la fermentación pueden variar y ser característicos de cada estirpe, determinando así la calidad final del vino y, por tanto, los resultados de las evaluaciones sensoriales. El tipo y cantidad de estos compuestos, volátiles y no volátiles, que se producen durante el metabolismo fermentativo de las levaduras, depende de los factores ambientales que afectan al crecimiento de la levadura (composición del mosto, temperatura, aireación, etc.) y de factores genéticos estables característicos de cada estirpe específica de levadura. La fuerte correlación existente entre los metabolitos producidos durante la fermentación y la estirpe de levadura utilizada ha motivado la selección y utilización de las estirpes productoras de aromas y sabores más agradables, muchas de las cuales están hoy disponibles en el mercado de productos enológicos.

Estudios recientes sugieren que algunas levaduras no-*Saccharomyces* pueden ser utilizadas para corregir ciertos defectos del vino o para intensificar o mejorar sus propiedades organolépticas, y conseguir así productos más originales y diferenciados. El principal origen de esta mejora de la complejidad aromática de los vinos parece ser la sucesión de poblaciones de levaduras distintas durante la fermentación alcohólica con alternancia de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. A diferencia de las levaduras *Saccharomyces*, las no-*Saccharomyces* secretan al medio más enzimas (como esterasas, glicosidasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc.), que degradan ciertos componentes del mosto mejorando algunos procesos tecnológicos (como la maceración, filtración, clarificación, rendimiento alcohólico, extracción de color, etc.) y, en general, la calidad aromática del vino. Algunas de estas levaduras no-*Saccharomyces* parecen tener efectos interesantes sobre el aroma y sabor de bebidas alcohólicas (Cabaris, et al., 1999; Ciani and Maccarelli, 1998; Ciani and Picciotti, 1995; Herraiz, et al., 1990; Moreno, et al., 1991), además de producir baja cantidad de compuestos indeseables en el vino como acetaldehído, acetoína, ácido acético, y acetato de etilo (Cabrera, et al., 1988; Ciani and Ferraro, 1998; Herraiz, et al., 1990; Martinez, et al., 1990). Por esta razón se ha evaluado su utilidad para reducir la acidez volátil del vino co-inoculadas con levaduras *Saccharomyces* en cultivos mixtos o de forma secuencial (Ciani, et al., 2006; Ciani and Picciotti, 1995; Herraiz, et al., 1990), y de manera singular en vinos elaborados con mostos muy ricos en azúcar (de 350 a 450 g/L) procedentes de uvas botritizadas (Laffon-Lafourcade, et al., 1981).

Se sabe que la limitación de oxígeno durante la fermentación influye más en la supervivencia de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, como *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*, que en *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen, et al., 2001). Además, se ha descrito que las interacciones entre células inhiben el crecimiento de estas dos levaduras. En presencia de altas concentraciones de células de *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe el crecimiento de *T. delbrueckii* y de *K. thermotolerans* (Hansen, et al., 2001; Nissen and Arneborg, 2003; Nissen, et al., 2003). A pesar de todo esto, tanto *T. delbrueckii* como *K. thermotolerans* se pueden adquirir en el mercado (marcas Hansen o Lallemand) para elaborar vino; aunque su utilidad práctica en bodegas comerciales está por confirmar y aún no son levaduras vínicas de uso generalizado. Ambas compañías aseguran resultados positivos y fermentaciones correctas, pero la realidad es que con mostos de graduación superior a 13 °Be la fermentación es muy lenta y se suele parar, comprometiendo así la calidad del vino elaborado.

Las levaduras *T. delbrueckii* actuarían en el comienzo de la fermentación alcohólica en clara competencia por los nutrientes con las levaduras *Saccharomyces* silvestres del mosto en la inoculación secuencial (según la propuesta de Lallemand), o con las levaduras *Saccharomyces* del mosto más las inoculadas (según la propuesta de coinoculación inicial de Hansen). En ambos casos serían remplazadas progresivamente por la estirpe inoculada de *S. cerevisiae* que dominaría la fermentación. En ningún caso *T. delbrueckii* llegaría a ser la levadura dominante de la fermentación. Su supuesta aportación positiva a la calidad del vino se limitaría al principio de fermentación, y esta aportación puede ser fácilmente modificada por las levaduras dominantes en el proceso a partir de fermentación tumultuosa hasta el final. La cantidad de estas levaduras no-*Saccharomyces* al final de fermentación es muy pequeña, y la mayoría no son viables debido a su sensibilidad a concentraciones de alcohol superiores 10 °GL (Hansen, et al., 2001), aunque esta sensibilidad puede mejorar ligeramente si se añade al mosto ergosterol y Tween 80 (Pina, et al., 2004).

Evidentemente, el efecto global de estas levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación y la calidad del vino dependen estrictamente de la proporción de levaduras *Saccharomyces*/no-*Saccharomyces* del inóculo (Comitini, et al., 2011), lo que nos obliga a optimizar el proceso para las condiciones concretas de cada vinificación en bodega. Una posible

optimización consiste en inocular el mosto con levaduras no-*Saccharomyces* asesinas (killer) que maten las levaduras *Saccharomyces* y puedan imponerse mejor durante la fermentación y contribuir de forma más significativa a la mejora de la calidad del vino. El objetivo del presente trabajo fue analizar la idoneidad de nuevas estirpes de levaduras killer *Torulaspota* para ser producidas con un esquema de operativo similar al utilizado para las levaduras *Saccharomyces* con vistas a una posible producción industrial y comercialización.

2 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 - Cepas de levaduras

Se utilizaron 5 cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*: EX85 (autóctona seleccionada comercial, K2), EX85R (resistente a cicloheximida, no killer K2), E7AR1 (resistente a cicloheximida, K2), Rod23 (resistente a rodamina, K2) y EX229 (autóctona silvestre, *Klus*); y cuatro de *Torulaspota delbrueckii*: EX1180 (autóctona silvestre, *Kbarr*), EX118011C4 (resistente a cicloheximida, *Kbarr*), EX1180K- (mutante espontáneo, resistente a cicloheximida, no killer *Kbarr*), T.Lallemand (comercial de Lallemand).

2.2 – Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y determinación de rendimientos

Se emplearon tres medios de cultivo: YEPD (20 g/L glucosa, 20 g/L extracto de levadura, 10 g/L peptona), Melaza 1X (50 mL/L melaza, 2 g/L extracto de levadura, 0,75g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 1g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/L tiamina, 0.125 mg/L biotina, 10 mg/L pantotenato cálcico, pH 3,5-4 ajustado con HCl), y Melaza 2X (100 mL/L melaza, 4 g/L extracto de levadura, 0,75g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 1g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/L tiamina, 0.125 mg/L biotina, 10 mg/L pantotenato cálcico, pH 3,5-4 ajustado con HCl).

Se partió de cultivo puro conservado a -80°C , se inoculo en placa de YEPD y se incubó a 30°C 48h. Posteriormente, se inocularon 5mL de YEPD líquido y se incubaron durante 24h a 30°C con agitación (200 rpm). A partir de estos cultivos se inocularon (10%) los medios de producción de levaduras (YEPD, Melazas 1X y Melazas 2X) y se incubaron a 30°C durante 4 días con agitación constante (200 rpm).

Se realizó un seguimiento del crecimiento determinando diariamente la OD_{600nm} (las muestras se diluyeron en agua hasta que la OD alcanzó un valor entre 0,05 y 0,6; y el blanco se realizó con el medio de cultivo estéril pertinentemente diluido) y el número de células totales (contadas en cámara de Neubauer después de diluir hasta 10^{-2} con agua destilada estéril).

Al inicio y al final del crecimiento se realizó el test de viabilidad (dilución de los cultivos hasta 10^{-5} en agua estéril y siembra de 100 μ L en placa de YEPD) a 30°C 48h. Al final del crecimiento se analizó el rendimiento en peso húmedo (se centrifugaron 30mL de cada cultivo a 3000 rpm/3 min, se retiró el sobrenadante y se pesó el precipitado), rendimiento en peso seco (los tubos con los precipitados de levaduras se incubaron abiertos en una estufa a 37°C, se pesaron los tubos cada semana hasta que la medida del peso se estabilizó), el porcentaje de células muertas y de yemas con azul de metileno (recuento de células azules muertas y yemas en foto realizada en microscopio óptico a 400 aumentos de una preparación con 5 μ L de azul de metileno 0,05% y 5 μ L de cultivo), viabilidad después del secado (por duplicado, 200 μ L de cultivo se centrifugaron 3 min a 3000 rpm, se quitó el sobrenadante, se resuspendieron en 20 μ L de YEPD líquido, se añadieron a un filtro de papel doblado, se depositaron en placas de Petri estériles, una placa se secó en una estufa a 37°C noche y otra placa igual se conservó húmeda a 4°C 1 noche, y seguidamente se resuspendieron las levaduras de los dos filtros correspondientes a cada cultivo, seco y húmedo, en 5mL de YEPD y se analizó la viabilidad en placa.

3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 – Crecimiento de las levaduras en distintos medios de cultivo

Se realizaron cultivos paralelos de todas las levaduras en medio YEPD (usual para la multiplicación de inoculas de levaduras en el laboratorio), Melazas 1X (usual para la multiplicación de las levaduras en la industria) y Melazas 2X (para intentar suplir alguna posible carencia nutritiva en alguna de nuestras levaduras). Se apreciaron diferencias en la evolución de la OD_{600nm} entre las distintas levaduras en todos los medios utilizados. No obstante, los valores alcanzados en los cultivos de todas las *Torulaspora* fueron siempre mayores que los correspondientes a *Saccharomyces* en los medios YEPD

y Melaza 1X. Esta diferencia fue menos patente con Melazas 2X, alcanzando algunos cultivos de *Saccharomyces* valores similares a los de *Torulaspota* (Figura 1A, 1B y 1C). Sorprendentemente, esta diferencia entre las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota* no se apreció en la evolución del número de células totales en ninguno de los medios utilizados, más bien al contrario, en varios puntos de muestreo el número de totales fue mayor en *Saccharomyces* que en *Torulaspota* (Figura 1D, 1E y 1F). Esto puede ser debido a que las levaduras *Torulaspota* tienen tendencia a flocular (Figura 2), lo que puede originar una sobre-estimación de los valores de OD_{600nm} en estas levaduras. En general, los valores más altos de OD_{600nm} y de células totales se obtuvieron con Melazas 1X, especialmente en los cultivos de después de 48 horas.

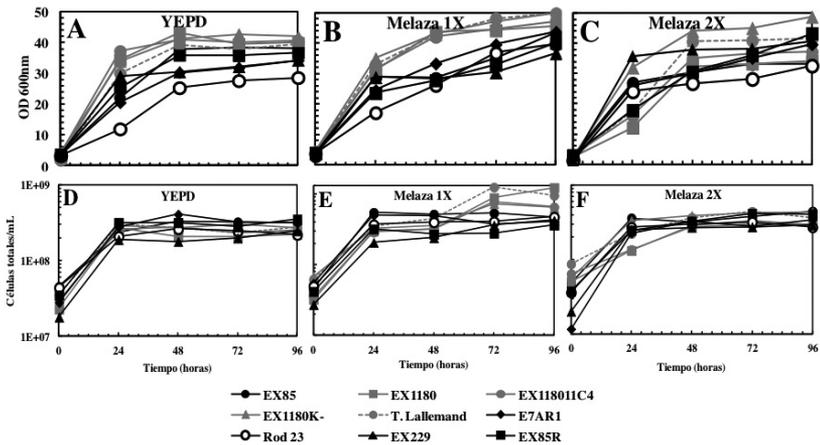
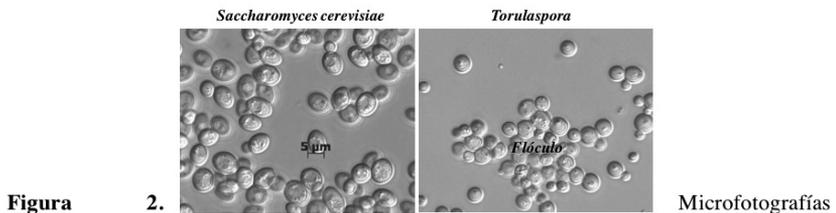


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de las levaduras en medio YEPD, Melazas 1X y Melazas 2X.



Figura

2.

3.2 – Rendimiento de los cultivos de levaduras

En general, comparando los rendimientos de los tres medios de cultivo para el conjunto de levaduras utilizadas, la mejor producción de levaduras correspondió a Melaza 1X, aunque aumentó considerablemente la muerte celular respecto a YEPD. No obstante, también aumentó considerablemente el número de viables antes y después del secado de las levaduras. Al aumentar la cantidad de nutrientes, Melaza 2X, disminuyó de forma decepcionante el rendimiento y la viabilidad de todas las levaduras (Figura 3). Esto podría ser debido a un posible incremento de la represión catabólica por exceso de azúcares (Efecto Crabtree) o a la presencia de mayor cantidad de los compuestos tóxicos habitualmente presentes en las melazas.

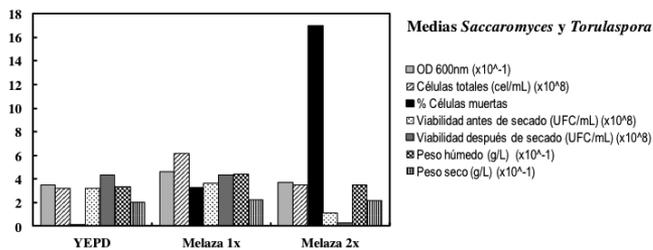


Figura 3. Medias del rendimiento del crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* en diferentes medios de cultivo.

Comparando los resultados en los tres medios de cultivo de las levaduras *Torulaspora* y *Saccharomyces* por separado, después de 4 días se observó que los rendimientos de los cultivos de *Torulaspora* fueron mejores que los de *Saccharomyces*, tanto en YEPD como en Melaza 1X, a pesar de que hubo más células muertas en los cultivos de *Torulaspora* (Figura 4).

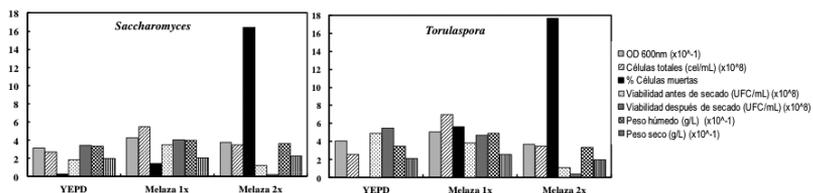


Figura 4. Rendimientos del crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* después de 4 días en diferentes medios de cultivo.

4 - CONCLUSIONES

La producción de levaduras *Torulaspota* en los medios habituales de laboratorio y la industria resulta más complicada que la de las levaduras *Saccharomyces* porque crecen más lentamente y pierden viabilidad a medida que el cultivo envejece. El incremento de nutrientes en el medio no mejora el rendimiento de la producción de levaduras *Torulaspota* ni *Saccharomyces*. La producción de levaduras *Torulaspota* resulta interesante si se alarga el tiempo de cultivo hasta tres días, con el consiguiente incremento en los costes de producción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos GR10088 (Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico, Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España). Matilde Maqueda ha sido becaria del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y Rocío Velázquez becaria de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación (Junta de Extremadura).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cabaris, J. C., Cabaris, M. T. and Flanzky, C. (1999). Tables de composition, *Oenologie-Fundaments Scientifique e Tecnologique*: París.
- Cabrera, M. J., Moreno, J., Ortega, J. M. and Medina, M. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in must from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 283-287.
- Ciani, M., Beco, L. and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 239-245.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998). Combined used of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 247-254.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 199-203.
- Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters* **17**, 1247-1250.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873-882.

- Fleet, G. H. and Heard, G. M. (1993). Yeast growth during fermentation In Fleet, G. H. (Ed), *Wine microbiology and biotechnology*, Harwood Academic Publishers: Bern, pp. 27-54.
- Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C. and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 541-547.
- Herraiz, G., Reglero, M., Herraiz, P. J., Alvarez, M. and Cabezudo, M. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulphur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 313-318.
- Laffon-Lafourcade, S., Lucmaret, V., Joyeux, A. and Ribèreau-Gayon, P. (1981). Utilisation de levains mixtes dans l'élaboration des vins de pourriture noble, en vue de réduire l'acidité volatile. *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France* **67**, 616-622.
- Martinez, J., Toledano, F. and Millan, C. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiol.* **7**, 217-225.
- Moreno, J., Millan, M. C., Ortega, J. M. and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J.Ind.Microbiol.* **7**, 181-190.
- Nissen, P. and Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **180**, 257-263.
- Nissen, P., Nielsen, D. and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cellcontact-mediated mechanism. *Yeast* **20**, 331-341.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A. and Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* **21**, 439-447.
- Ribèreau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 1-10.
- Suárez, J. A. (1990). Selección de levaduras vínicas: criterios, conservación y biotecnología. *Viti-vinicultura* **9**, 23-30.

INFLUENCIA DE LA MACERACIÓN PELICULAR Y DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL DE LEVADURAS EN VINOS BLANCOS

M^a Jesús JIMÉNEZ ⁽¹⁾; Zulema PIÑEIRO ⁽¹⁾; M^a Esther RODRÍGUEZ ⁽²⁾; Emma CANTOS ⁽¹⁾; Carmen CASTEJÓN ⁽¹⁾; Jesús CANTORAL ⁽²⁾; Belén PUERTAS ⁽¹⁾

RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado el efecto de dos novedosas estrategias de vinificación (maceración pelicular e inoculación secuencial de levaduras) con el objetivo de mejorar la calidad de vinos blancos (Chardonnay y Palomino fino), especialmente su perfil aromático. Los resultados obtenidos fueron diferentes dependiendo de la variedad de uva estudiada.

Los vinos de la variedad Chardonnay presentaban diferencias significativas en parámetros enológicos, ácidos orgánicos y compuestos volátiles tanto mayoritarios como minoritarios. Estas diferencias se reflejaron en la cata, donde los vinos mejor evaluados fueron los de la inoculación secuencial.

Los vinos de la variedad Palomino fino mostraron diferencias mucho menores. Solo se observaron diferencias significativas en los ácidos málico y succínico, y en algunos compuestos volátiles, tanto mayoritarios como minoritarios, aunque con menor grado de significación que en Chardonnay. En este caso la maceración pelicular fue el ensayo mejor puntuado, si bien hay que destacar que la implantación de las levaduras en la inoculación secuencial no fue tan exitosa como en Chardonnay.

PALABRAS CLAVE: Chardonnay, inoculación secuencial, levaduras comerciales, maceración pelicular, mtDNA-RFLP, Palomino fino, perfil aromático.

INTRODUCCIÓN

La fermentación espontánea del mosto de uva para la elaboración de vino constituye un complejo proceso microbiológico y bioquímico en el que las levaduras juegan un papel clave transformando los azúcares en etanol, dióxido de carbono y un gran número de

¹ IFAPA Centro Rancho de la Merced. CAPMA. Junta de Andalucía. Apdo. 589. 11471 Jerez de la Frontera. – Tfno: 671 560 352. Fax: 956 03 46 10. e-mail: mariab.puertas@juntadeandalucia.es

² Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz. Polígono del Río San Pedro s/n, 11500. Puerto Real. Cádiz, Spain

otros productos secundarios (FLEET y HEARD, 1993). Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de las distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En la primera fase cuando el grado alcohólico es bajo predominan levaduras de diversos géneros como *Kloeckera*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, etc. Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación pero a medida que ésta avanza y aumenta el grado alcohólico son desplazadas por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo las cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* las principales responsables de la fermentación alcohólica. Es esa diversidad de cepas de levaduras la que aporta al vino la complejidad y tipicidad en las características sensoriales (EGLI *et al.*, 1998; SWIEGERS *et al.*, 2005).

Sin embargo, la fermentación espontánea conlleva algunos riesgos para el proceso como por ejemplo, inicios tardíos, fermentaciones lentas, o proliferación de levaduras contaminantes u otras indígenas que no aporten al vino las características deseadas, además de conducir a resultados no reproducibles.

Para minimizar este tipo de problemas, en muchas regiones del mundo se utilizan desde hace años levaduras secas activas (LSA). Son levaduras normalmente comerciales, y su uso en la mayoría de las bodegas como cultivos iniciadores de las fermentaciones se ha convertido en una práctica común para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año. Además, el empleo de estas levaduras normaliza la microbiota inicial y, de esta forma, da lugar a fermentaciones controladas, con un consumo total de azúcares, evitando también el riesgo de contaminación por otros microorganismos no deseados. En los últimos años está aumentando la demanda en la utilización de nuevas cepas de levaduras adaptadas a los distintos tipos de vinos (PRETORIUS y BAUER, 2002). En este sentido están cobrando un especial interés las levaduras no-*Saccharomyces* las cuales pueden mejorar la composición química y propiedades sensoriales del vino. La fermentación mixta, utilizando cultivos iniciadores controlados de levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces*, es una forma práctica de aumentar la complejidad y mejorar las características específicas de los vinos (ROMANO *et al.*, 2003; CIANI y COMITINI, 2010).

Por otro lado, en la elaboración de vinos, en los que se ha empleado una maceración pre-fermentativa, se ha observado un perfil aromático diferente al de los vinos elaborados

de forma tradicional. El objetivo de este proceso es favorecer la extracción de constituyentes del hollejo, en particular de los precursores de aromas, obteniendo mayor intensidad y riqueza de aromas varietales, y extrayendo otros componentes que aporten al vino mayor estructura en boca (DARIAS-MARTIN *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar en los vinos de las variedades Chardonnay y Palomino fino de la cosecha de 2011, el efecto de la maceración pelicular y de la inoculación secuencial de dos levaduras comerciales, una cepa de la especie *T. delbrueckii* y otra de *S. cerevisiae*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Mostos

Este estudio se llevó a cabo en la campaña de 2011 con uva de las variedades Chardonnay y Palomino fino.

En los ensayos Control (CT) e Inoculación secuencial (IS) la uva se vendimió manualmente, se despalilló y se prensó en prensa neumática. A la salida de la prensa se adicionó anhídrido sulfuroso (40 ppm) y enzimas Lallzyme HC (1 g/Hl) para facilitar el desfangado, que se realizó a 4 °C durante 20 horas. Tras el desfangado el mosto se dividió en tres partes (triplicados) y se pasó a los fermentadores donde se corrigió la acidez total y se inocularon las levaduras.

La uva para el ensayo de maceración pelicular (MP) se dividió inicialmente en tres partes iguales. Se despalilló y se adicionó anhídrido sulfuroso (40 ppm) y enzimas Lallzyme Cuvee Blanc (2 g/100 Kg). Se mantuvo macerando en cámara durante 6 horas a 4°C. Posteriormente se pasó a prensa neumática. Al mosto se le adicionaron enzimas Lallzyme HC (1 g/Hl) para facilitar el desfangado y se mantuvo en cámara a 4 °C durante 20 horas.

Levaduras utilizadas

Los mostos fueron inoculados con las siguientes levaduras:

- Level 2TD® de Lallemand (Inoculación secuencial de la cepa *Torulaspota delbrueckii* E291 + una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* específica E491),

en el ensayo IS. La primera levadura inoculada fue *T. delbrueckii*, y cuando la densidad descendió 15 puntos se adicionó la segunda levadura de *S. cerevisiae*.

- Lalvin YSEO QA23® de Lallemend en los ensayos CT y MP

Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron por triplicado en depósitos de acero inoxidable de 100 L de capacidad con sistema de refrigeración por ducha de agua. Las levaduras comerciales se inocularon siguiendo las instrucciones del fabricante. La temperatura se controló a 17-18°C y la evolución de las fermentaciones se siguió mediante las medidas diarias de densidad y temperatura. Una vez finalizada la fermentación, el vino fue desliado, sulfitado, y tras un proceso de clarificación y estabilización en frío, embotellado y conservado hasta su posterior análisis químico y sensorial.

Control microbiológico

Se analizó la implantación de las levaduras inoculadas al final de las fermentaciones para los ensayos de inoculación control (CT) e inoculación secuencial (IS). El método utilizado fue el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial. De las muestras tomadas del mosto al finalizar las fermentaciones se hicieron diluciones y siembra en placa de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa y 2% agar) las cuales fueron incubadas durante 3-4 días a 30 °C. Después se seleccionaron al azar 15 aislamientos para su estudio por mtDNA-RFLP. Cada aislamiento fue crecido en medio líquido YPD durante toda la noche, recogiendo posteriormente el precipitado mediante centrifugación a 4000 rpm, 20 °C. El DNA fue purificado aplicando el método descrito por RODRÍGUEZ *et al.*, 2011. Los fragmentos de restricción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% hechos con el tampón TBE 1X y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. La imagen de cada gel fue digitalizada en el aparato Molecular Imager (Gel Doc XR) y analizados utilizando el software Quantity One 1-D (Bio-Rad).

Determinaciones analíticas de los mostos y los vinos

Los parámetros químico-enológicos de los mostos y vinos mostrados en las tablas se determinaron siguiendo los métodos internacionales de análisis, entre ellos la determinación de los compuestos volátiles mayoritarios (OIV, 2012). Los compuestos minoritarios se analizaron mediante la técnica de micro-extracción en fase sólida-espacio de cabeza y cromatografía de gases-espectrometría de masas, según la metodología descrita por BARROS *et al.*, 2012.

La valoración sensorial de los vinos se llevó a cabo por un panel de 8 catadores expertos. Para la selección y entrenamiento de los catadores así como para la copa de cata se han seguido las normas AENOR (UNE 87024-1:1995 y UNE 87022:1992). Primero, para conocer si había diferencias entre los ensayos, se realizaron pruebas triangulares AENOR (norma UNE-EN ISO 4120:2008). Después se realizaron las catas descriptivas con una ficha de cata que incluía diversos descriptores puntuados en una escala de 0 a 10.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el software estadístico Statistix versión 8.0. Los datos se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA) y se analizaron las diferencias significativas según el criterio de Tukey con un nivel de significación $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Mostos

Las características de los mostos desfangados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros enológicos de los mostos desfangados

	CHARDONNAY			PALOMINO FINO		
	CT	IS	MP	CT	IS	MP
°Brix	21,6	21,3	21,8	21,6	21,2	21,3
Acidez total (g/L de TH ₂)	5,64	5,64	5,18	3,42	3,50	2,78
pH	3,47	3,51	3,55	3,77	3,82	3,86
Acido tartárico (g/L)	3,91	3,82	3,49	6,15	6,02	4,54
Acido málico (g/L)	2,91	3,52	3,34	0,52	0,53	0,61
Sulfuroso libre (ppm)	15	10	13	20	18	11
Sulfuroso total (ppm)	42	31	35	45	45	39

Cinética fermentativa y control de implantación de las levaduras inoculadas

Las fermentaciones transcurrieron normalmente, aunque se observaron algunas diferencias. Para ambas variedades la velocidad de fermentación en fase tumultuosa fue similar en las fermentaciones inoculadas con la levadura QA23 *S. cerevisiae* (CT y MP), y más lenta en las fermentaciones IS. En cualquier caso, todas las levaduras completaron el proceso correctamente dando lugar a vinos con menos de 2,2 g/L de azúcares residuales.

Tabla 2. Control de implantación de las levaduras al final de la fermentación alcohólica

Ensayo	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	QA23 (Sc)	E491 (Sc)	E291 (Td)	Otras	QA23 (Sc)	E491 (Sc)	E291 (Td)	Otras
CT 1	77%			23%	67%		27%	6%
CT 2	100%				87%		13%	
CT 3	100%				93%		7%	
IS 1			100%				87%	13%
IS 2			100%			20%	47%	33%
IS 3			100%				60%	40%

En la variedad Chardonnay, el análisis de los perfiles de restricción, de un total de 42 aislamientos, mostró que las levaduras inoculadas al inicio del proceso se habían implantado, en el ensayo CT en un 77 % en uno de los fermentadores (CT1) y en el 100 % en los otros dos, CT2 y CT3 (Tabla 2). En el caso de la fermentación IS, tras el análisis de 45 aislamientos, se observó que la cepa de *T. delbrueckii* TD E291, inoculada al principio, no solo se implantó al inicio, sino que fue dominante al 100 % al final de cada fermentación ensayada, incluso tras la inoculación de la cepa de *S. cerevisiae* E491. En los ensayos IS se ha puesto de manifiesto que las levaduras inoculadas no se han implantado como se esperaba, verificándose que la levadura *T. delbrueckii* es capaz de agotar los azúcares del mosto al final de la fermentación, además de su prevalencia cuando el grado alcohólico es elevado, como también se ha observado en otros estudios (GANGA y MARTÍNEZ, 2004).

En la variedad Palomino fino, el análisis de un total de 45 aislamientos mostró que la levadura inoculada, QA23 *S. cerevisiae*, al inicio del proceso se implantó en los tres

ensayos CT en distintos porcentajes, según la replica (Tabla 2); además se detectó la presencia de la *T. delbrueckii* TD E291, que no había sido inoculada, siendo este hecho indicativo de contaminación de los fermentadores. En el caso de los ensayos IS se analizaron también 45 aislamientos y se observó que la cepa de *T. delbrueckii* TD E291, inoculada al principio, no se implantó al 100 % como en el Chardonnay. Asimismo, aparecieron otras levaduras no inoculadas, mientras que solo apareció la cepa de levadura inoculada *S. cerevisiae* E491 en uno de los fermentadores (IS2) en un 20 %, por tanto, la dinámica de las levaduras inoculadas tampoco fue la esperada según la teoría, ya que al final tendría que estar presente mayoritariamente la levadura *S. cerevisiae* inoculada.

Determinaciones analíticas de los vinos

Los resultados de las determinaciones analíticas de los vinos de Chardonnay y de Palomino fino se muestran en la Tablas 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En todas las tablas letras diferentes equivalen a diferencias significativas (n=3) de los parámetros entre los ensayos. n.s.; nivel de significación, ---; no significativo, *; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001

Tabla 3. Parámetros químico enológicos

	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	CT	IS	MP	n.s.	CT	IS	MP	n.s.
Alcohol (%v/v)	13,1 ab	12,6 b	13,6 ^a	**	13,4	13,4	13,4	---
Azúcares (g/L)	1,24 ^b	1,26 b	2,11 ^a	***	1,66	1,65	1,20	---
Acidez total (g/L TH ₂)	5,88 ^a	5,12 b	5,90 ^a	***	3,94	3,58	4,13	---
Acidez volátil (g/L AcH)	0,32 ^a	0,24 b	0,20 ^b	***	0,26	0,24	0,24	---
pH	3,36 ^b	3,49 a	3,42 ab	**	3,41	3,39	3,35	---
Glicerina (g/L)	6,26 ^b	7,32 a	7,04 ^a	**	6,96	7,25	6,89	---

Los vinos de Chardonnay IS tuvieron menor graduación alcohólica, menor acidez total, menor acidez volátil y mayor contenido en glicerol, similar comportamiento se ha descrito para la variedad Pedro Jiménez (MATURANO *et al.*, 2012). Los vinos Chardonnay MP presentaron 1 g/L más de azúcar y mayor cantidad de glicerina que los CT.

Las técnicas aplicadas IS y MP en la variedad Palomino fino no han tenido efecto significativo sobre los parámetros químico-enológicos mostrados en la Tabla 3.

Tabla 4. Ácidos orgánicos

	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	CT	IS	MP	n.s.	CT	IS	MP	n.s.
Cítrico (g/L)	0,48	0,47	0,47	---	0,39	0,34	0,40	---
Tartárico (g/L)	1,58 ^a	1,17 ^b	1,34 ^b	**	1,83	2,13	2,15	---
Málico (g/L)	3,27 ^a	2,78 ^b	3,26 ^a	***	0,60 ^a	0,36 ^b	0,53 ^a	***
Láctico (g/L)	0,19	0,15	0,20	---	0,24	0,30	0,22	---
Succínico (g/L)	0,53 ^b	0,84 ^a	0,74 ^a	***	0,58 ^b	0,77 ^a	0,50 ^b	***
Acético (g/L)	0,30 ^a	0,23 ^b	0,19 ^b	*	0,26	0,23	0,21	---

Para ambas técnicas, IS y MP, en los vinos de Chardonnay se obtuvieron concentraciones más bajas de los ácidos tartárico y acético, y más altas del ácido succínico, respecto al CT. El ácido málico disminuyó con la IS, pero no con la MP. La obtención de un menor contenido en acético coincide con estudios similares realizados en mostos fermentados con *Saccharomyces* y *Torulasporea* (BELY *et al.*, 2008) u otras especies de levaduras (CIANI y FERRARO, 1996).

Los vinos IS de Palomino fino presentaron mayor cantidad de succínico y menor de málico que el CT, comportamiento análogo al de la variedad Chardonnay. Sin embargo, en los vinos MP no se encontraron diferencias significativas de succínico respecto al CT. En los vinos de Palomino fino no hubo diferencias significativas en los ácidos acético y tartárico.

En ninguna de las dos variedades se detectaron diferencias en los ácidos cítrico y láctico.

Tabla 5. Parámetros relacionados con el color

	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	CT	IS	MP	n.s.	CT	IS	MP	n.s.
D.O. 420 nm	0,090 ^b	0,089 ^b	0,108 ^a	**	0.109	0.124	0.120	---
D.O. 520 nm	0,020 ^b	0,020 ^b	0,029 ^a	*	0.020	0.028	0.026	---
I.F.C.	3,91 ^b	3,68 ^b	4,83 ^a	***	4,09	4,04	4,74	---
I.P.T.	6,19 ^b	5,32 ^c	7,30 ^a	*	6,83	6,63	7,50	---
L	96,70	95,61	96,17	---	96,70	95,61	96,17	---
a*	-0,84	-1,25	-0,79	---	-1,64	-1,43	-1,49	---
b*	12,17	12,86	13,66	---	13,76	16,04	15,00	---

Los vinos Chardonnay MP presentaron valores más altos de absorbancias, tanto a 420 nm (amarillos) como a 520 nm (rojos), y mayores valores de I.F.C. e I.P.T. Esto es lógico, ya que los vinos procedentes de maceración en las condiciones realizadas, y con poco SO₂, pueden mostrar más tendencia al pardeamiento al ser mayor la extracción de compuestos fenólicos (GOMEZ-MÍGUEZ *et al.*, 2007)

En cuanto a los tonos verdosos, los vinos Chardonnay IS son los que presentaron valores más negativos de la coordenada CIELab a* (relacionada con los tonos verdes) y los Chardonnay MP los que presentaron valores más altos de la coordenada CIELab b* (relacionada con los tonos amarillos), aunque las diferencias no fueron significativas en ninguna de ellas (a* y b*).

En los vinos de Palomino fino, no se encontraron diferencias significativas ni en las coordenadas CIELab ni en las absorbancias a 420 y 520 nm, ni siquiera en los vinos MP respecto al CT.

Tabla 6. Compuestos volátiles minoritarios

	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	CT	IS	MP	n.s.	CT	IS	MP	n.s.
Esteres (ppm)	80,35 ^a	64,00 ^b	66,34 ^b	**	23,71	22,40	22,32	---
Alcoholes (ppm)	19,19 ^b	13,98 ^c	23,50 ^a	***	228,40 ^a	198,52 ^{ab}	179,71 ^b	*
Ácidos (ppm)	20,72 ^a	15,54 ^b	16,00 ^{ab}	*	17,12 ^{ab}	12,35 ^b	20,80 ^a	*
Comp. carbonílicos (ppm)	3,89	4,82	3,39	---	3,15	3,30	0,90	---
Terpenos (ppm)	0,08 ^b	0,09 ^b	0,13 ^a	***	0,07 ^b	0,06 ^b	0,10 ^a	***
Suma total (ppm)	124,24 ^a	97,53 ^b	109,36 ^{ab}	**	119,96	103,99	110,58	---

Para los vinos de Chardonnay, las diferencias más significativas se detectaron en terpenos y alcoholes. Se encontraron mayores contenidos de estos compuestos en los vinos MP, si bien, el contenido en ésteres de los vinos CT determinó que fueran estos vinos los que presentaron mayor composición aromática global.

En el caso de los vinos IS, los contenidos en acetatos (compuestos asociados con notas afrutadas) resultaron superiores a CT y MP, tal como aparece reflejado en otros estudios (IZQUIERDO CANAS *et al.*, 2011).

En los vinos de Palomino fino, las diferencias más significativas se encontraron en el contenido de terpenos, siendo mayores en los vinos MP. Para los alcoholes y los ácidos, se describen nuevamente diferencias significativas en los vinos MP respecto al CT e IS. En el resto de compuestos no se detectaron diferencias apreciables.

Los esterres incluyen: acetato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de hexilo, lactato de etilo, octanoato de metilo y 2-fenil acetato. Los alcoholes incluyen: 1-hexanol, c-3-hexen-1-ol y 2-feniletanol. Los ácidos incluyen: isobutírico, octanoico, decanoico e isovalérico. Los compuestos carbonílicos incluyen: hexanal, benzaldehído y diacetilo. Los terpenos incluyen: geraniol, linalol, terpineol y nerol.

Tabla 7. Compuestos volátiles mayoritarios

	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	CT	IS	MP	n.s.	CT	IS	MP	n.s.
Acetaldehído (ppm)	62 ^a	26 ^c	48 ^b	***	37	54	38	---
Acetato de etilo (ppm)	34	31	24	---	29	23	17	---
Metanol (ppm)	29 ^b	28 ^b	63 ^a	***	45 ^a	37 ^b	79 ^a	**
N-Propanol (ppm)	19 ^b	67 ^a	21 ^b	***	20 ^b	72 ^a	17 ^b	***
Isobutanol (ppm)	13 ^b	28 ^a	15 ^b	***	23	32	20	---
Isoamílicos (ppm)	145 ^b	190 ^a	165 ^b	***	151 ^b	218 ^a	196 ^b	**
Σ Alcoholes superiores (ppm)	177 ^c	285 ^a	201 ^b	***	194 ^b	322 ^a	242 ^b	***

En los vinos de Chardonnay, las mayores diferencias se encontraron en los alcoholes superiores (N-propanol, isobutanol e isoamílicos), con valores más altos en los vinos IS respecto a los MP y los CT. Los vinos MP son los que presentaron, como era de esperar, mayor contenido de metanol.

En los vinos de Palomino las concentraciones de N-propanol y de isoamílicos fueron muy superiores en los vinos IS respecto a los CT y MP. Al igual que en los vinos de Chardonnay, los MP fueron los que presentaron mayor contenido de metanol.

Análisis sensorial de los vinos

Se constató que no había diferencias sensoriales, entre los triplicados de cada ensayo, mediante las pruebas triangulares realizadas.

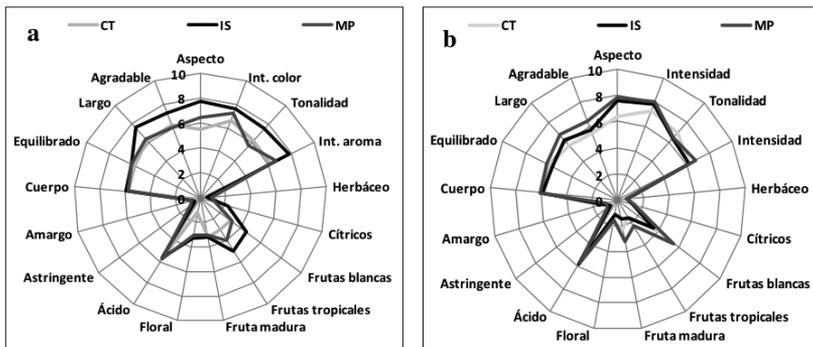
Posteriormente se realizaron las catas descriptivas. En la Figura 1 se muestran los resultados del análisis sensorial. En el Chardonnay fueron mejor valorados los vinos IS en la mayor parte de los atributos. Sin embargo, en los vinos de Palomino fino los mejor valorados fueron los MP.

Los vinos de Chardonnay con IS, en los que la levadura dominante al final de la fermentación fue *T. delbrueckii*, destacaron por su mayor intensidad aromática, sobre todo tanto de notas afrutadas como de cítricos, fruta blanca y tropical, de manera que se podría correlacionar la presencia de esta levadura con las características sensoriales obtenidas

en los vinos IS. Asimismo, resultaron más largos y agradables en boca. Los vinos MP fueron más similares a los vinos CT, observándose en estos últimos la presencia mayoritaria de la levadura inoculada QA23 al finalizar el proceso de fermentación.

En el caso de la variedad Palomino fino, los vinos preferidos fueron los MP, aunque las diferencias no fueron tan acusadas como para los IS en Chardonnay.

Figura 1. Gráficas del análisis sensorial. a) Chardonnay b) Palomino fino



4. AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados han sido obtenidos en el marco del proyecto RTA2009-00022-C02-00, de la convocatoria de proyectos I+D del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), cofinanciado con recursos procedentes del FEDER, en el marco del Programa Operativo de Economía basada en el Conocimiento.

Asimismo, los autores agradecen a Lallemand (José Maria Heras) tanto el asesoramiento técnico como el suministro de levaduras, nutrientes y enzimas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Análisis sensorial. 2ª Edición. Normas UNE. Ediciones AENOR. 2010.
- BARROS, E.P.; MOREIRA, N.; PEREIRA, G.E.; FERREIRA LEITE, S.G.; MORAES REZENDE, C.; GUEDES DE PINHO, P. Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines. *Talanta*, 101, 177-186. 2012.
- BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMARÈDE, I.; DUBORDIEU, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312-320. 2008.
- CIANI, M.; FERRARO, L. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Environm. Microbiol.* 62, 128-132. 1996.
- CIANI, M.; COMITINI, F.; Mannazzu, I.; domizio, P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeast in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123-133. 2010.
- DARIAS-MARTIN, J. J.; DIAZ-GONZALEZ, D.; DIAZ-RODERO, C. Influence of two pressing process on the quality of must in White wine production. *J. Food. Eng.* 63, 335-340. 2004.
- EGLI, C.M.; EDIGER, W.D.; MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789. 1998.
- FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27-54. 1993.
- GANGA, M.A.; MARTÍNEZ, C. Effect of wine yeast monoculture practice on biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol* 96: 76-83. 2004.
- GÓMEZ-MÍGUEZ, M.J.; GÓNZALEZ-MIRET, M.L.; HERNANZ, D.; FERNÁNDEZ, M.A.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Effects of prefermentative skin contact conditions on color of white wines. *J. Food. Eng.* 78, 238-245. 2007.
- IZQUIERDO CANAS, P.M.; PALACIOS GARCIA, A.T.; GARCIA ROMERO, E. Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter. *Vitis*, 50, 177-182. 2011.
- MATURANO, Y.P.; RODRIGUEZ ASSAF, L.A.; TORO, M.E.; NALLY, M.C.; VALLEJO, M.; CASTELLANOS DE FIGUEROA, L.I.; COMBINA, M.; VAZQUEZ, F.
- Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43-50, 2012.

- O.I.V. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Paris. Office International de la Vigne et du Vin. 2012.
- PRETORIUS, I.S.; BAUER, F.F. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20,426-432. 2002.
- RODRÍGUEZ, M.E.; INFANTE, J.J.; MOLINA, M., REBORDINOS, L.; CANTORAL, J.M. Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 331-335. 2011.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180. 2003.
- SWIEGER, J.H.; BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P.A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139-173. 2005.

COMBINAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES E SISTEMAS DE INFORMAÇÃO PARA IDENTIFICAR INEQUIVOCAMENTE CULTIVARES DE *VITIS VINIFERA*

Ana Raquel SANTOS¹; André PARDAL²; Daniel DUARTE¹; Leonor NOVAIS³; Fernando DELGADO⁴, José EIRAS-DIAS⁵, Isabel ANDRADE⁴, António CUNHA² and Ana Catarina GOMES^{1*}

RESUMO

A seleção e o plantio de uma vinha são fatores críticos no futuro sucesso da produção de vinho. Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema integrado que permita não só a caracterização genética inequívoca da planta, em qualquer fase do seu desenvolvimento, como também a sua identificação ubíqua após plantio, útil em todo o processo de gestão da vinha. Este sistema é suportado por três módulos:

(1) um serviço único de genotipagem otimizado, com base em 14 microssatélites e num protocolo de ADN a partir do lenho da videira, permitindo assim obter uma melhor caracterização genética da videira a menores custos;

(2) um TAG de frequência de rádio (RFID) para implante na videira, com 2,12 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento, e que emite a 125 kHz. Neste trabalho verificámos que a introdução destes TAGs não teve impacto na fisiologia da videira;

(3) um dispositivo móvel para ler as etiquetas e estabelecer a interface com o utilizador, suportado por uma base de dados de gestão da vinha.

Globalmente, combinámos tecnologias moleculares com sistemas de informação, com a expectativa de contribuir para uma melhoria na gestão da vinha ao longo de todo o ciclo de produção.

Palavras-chave: Microssatélites, videira, base de dados, sistemas de identificação por radiofrequência.

¹Unidade de Genómica, Biocant, Parque Tecnológico de Cantanhede, Núcleo 04, Lote 3, 3060-197 Cantanhede, Portugal email: *acgomes@biocant.pt

²Instituto Pedro Nunes, Rua Pedro Nunes, 3030-199 Coimbra, Portugal

³Adega Cooperativa de Cantanhede, C.R.L., Rua Eng. Amaro da Costa, N°117, 3060-170 Cantanhede, Portugal

⁴ESAC - Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal

⁵INIA- Dois Portos, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, Quinta da Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Portugal

1-INTRODUÇÃO

Sendo o sector da vinha e do vinho um dos mais importantes de toda a produção agrícola em Portugal, o aumento da competitividade do sector é fundamental quer para o desenvolvimento da agricultura quer do próprio país. A competitividade é atingida pela redução dos custos de produção e pelo aumento do valor do produto final que passa, fundamentalmente, pela melhoria da qualidade. A racionalização da utilização dos fatores de produção contribui decisivamente para a redução dos impactos ambientais de qualquer cultura e, em particular, da vinha (Braga, 2009).

Neste trabalho, conjugamos tecnologias moleculares e tecnologias de informação com o objetivo de desenvolver um sistema integrado de gestão da videira, contribuindo assim para uma melhoria nos fatores de produção da vinha. As duas questões subjacentes a este trabalho e às quais pretendemos dar resposta são: como é que conseguimos assegurar a identidade da videira, numa fase pré-plantio, e desta forma mitigar os custos com replantação de vinhas? e Como é que podemos contribuir para uma gestão videira-a-videira?

Para responder à primeira questão, há que ter em consideração a identificação de variedades de videira, que tem sido tradicionalmente baseada na ampelografia. No entanto, esta técnica é bastante afetada pela fase do ciclo vegetativo, pelas condições ambientais, e muitas é vezes errônea (CARIMI *et al.* 2011). Assim, desde o surgimento dos marcadores moleculares, os Microsatélites (SSRs) têm sido dos mais utilizados na identificação de cultivares de videira. No entanto, a caracterização genética de videiras é quase sempre feita a partir de ADN das folhas, pelo que em determinadas situações é necessário recolher ADN de outros tecidos, nomeadamente, quando a videira se encontra em repouso vegetativo, quando a videira é propagada por enxertia e raramente existe folhagem, ou mesmo nos porta-exertos (LIN and WALKER, 1997). Sendo a correcta identificação de cultivares de extrema importância, torna-se assim imperativo haver alternativas à recolha de ADN através da folha e deste modo procedeu-se à optimização de um protocolo de extracção de ADN a partir do lenho da videira, para posteriormente identificar as cultivares pelo seu perfil genético de microsatélites.

Já para responder à segunda questão, há que desenvolver um sistema ubíquo de identi-

ficação de videiras na vinha e, para tal, uma das hipóteses será explorar as novas tecnologias de rastreabilidade baseadas em identificação por radiofrequências (RFID), que permitem a rápida identificação da planta assim como o acesso remoto a uma base de dados de gestão da vinha. Estes sistemas já são amplamente utilizados na identificação de bens e animais, e a sua utilização em plantas começa a dar os primeiros passos (LUVISI *et al.* 2010). Um sistema RFID é composto por três componentes principais: identificador (ou *TAG*), leitor e base de dados, em que a *TAG* envia a identificação dos dados, e estes são recebidos pelo leitor e transmitidos ao sistema de base de dados.

Assim, o nosso objetivo é de uma forma integrada responder a ambas as questões levantadas, aplicando tecnologias moleculares e de informação, ambas suportadas por uma base de dados robusta que incorpore todos os dados importantes no desenvolvimento da vinha, e desta forma permita um aumento da eficiência na sua gestão.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Identificação molecular da videira

Foram colhidas – folhas e lenho – de cerca de 400 amostras, representantes da biodiversidade existente em Portugal. O ADN das folhas foi extraído usando o Kit NucleoSpin da Macherey-Nagel, enquanto que para a extração do ADN do lenho foi desenvolvido um protocolo proprietário. Posteriormente foi feita uma avaliação da qualidade do ADN por espectrofotometria e PCR em tempo real.

Para a identificação molecular da casta da videira, foi selecionado um conjunto de 14 microssatélites (SSRs): os seis *loci* recomendados pela OIV, nº 801 a 806 em OIV (2009) (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 e VVS2); os três *loci* propostos pelo projeto GrapGen06 (VVMD32, VVMD25 e VVMD28) (BOWERS *et al.* 1999), e adicionalmente cinco *loci* propiciadores de uma maior resolução genética (VVIb01, VVIq52, VVIh54 e VVIIn16) (MERDINOGLU *et al.* 2005). Os microssatélites foram amplificados em multiplex usando primers marcados com fluoróforos (Applied Biosystems). Desta forma, os 14 SSRs foram agrupados em apenas 3 reações multiplex, o que permite uma redução substancial dos seus custos de análise. As reações em PCR Multiplex foram realizadas num volume final de 12.5 µL e a separação dos produtos de PCR

foi feita por electroforese capilar no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para a análise de fragmentos usou-se o software Genemapper (Applied Biosystems) e como tamanho *standard* o GeneScan 500 Liz (Applied Biosystems).

2.2-Inserção da TAG RFID na videira e avaliação do impacto deste na fisiologia da planta

Para a identificação da videira seleccionaram-se TAGs de RFID cilíndricos com dimensão de 2,12 x ø8mm, e que emitiam a 125 kHz, segundo o protocolo EM4102 (Figura 1 A). Para o ensaio seleccionaram-se 40 videiras adultas da casta Baga e 40 videiras da casta Touriga Nacional, todas elas na Quinta da Recochina, Cantanhede. Em cada casta foram inseridos identificadores de RFID em 20 videiras, sendo as restantes 20 videiras, sem identificador, consideradas como testemunha. Nestas videiras adultas a perfuração para a inserção do RFID foi feita no tronco a 30cm do solo, em direcção diagonal, recorrendo a um berbequim com uma broca de 3mm, sendo a TAG instalada a 3cm de profundidade (Figura 1 B). Esta operação foi realizada quando as videiras se encontravam no estado fenológico “gomo de algodão”. O impacto da inserção da TAG RFID na videira foi avaliado através da medição dos seguintes parâmetros: evolução do estado fenológico, abroilhamento, fertilidade, área foliar, densidade do coberto vegetal, evolução da maturação das uvas e caracterização quantitativa da vindima.

Foram ainda testados 40 enxerto-prontos da casta Syrah, onde a perfuração para a inserção do RFID foi feita recorrendo também a um berbequim com uma broca de 3mm na vertical, na zona do lacre, sendo a TAG instalada a 15mm e a 35mm de profundidade (Figura 1 C). Esta operação foi realizada imediatamente antes da plantação das videiras, quando estas se encontravam no estado fenológico “gomo de algodão”. Posteriormente mediu-se a taxa de vingamento dos enxertos prontos, como indicador do impacto do TAG na videira.

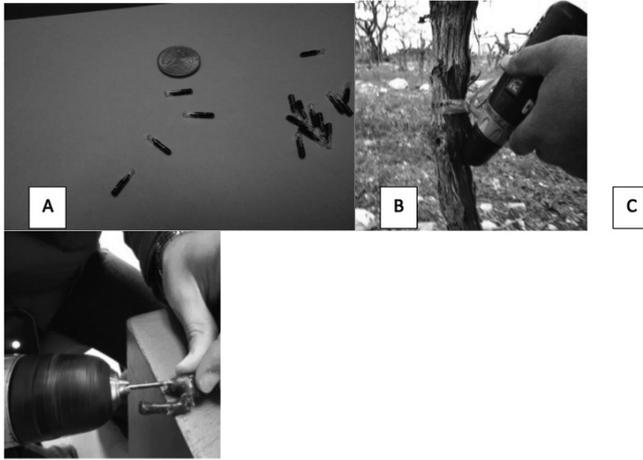


Figura 1- (A) TAGs RFID inseridas na videira; (B) Inserção da TAG em videiras adultas; (C) Inserção da TAG em enxertos prontos

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Identificação molecular da videira

Com o objetivo de desenvolver um método eficaz para genotipagem de videira foram seleccionados 14 microssatélites nucleares que incluem os seis SSRs recomendados pela OIV, três usados no GrapeGen06 e adicionalmente cinco seleccionados por nós, indicados na literatura, pelo seu poder discriminatório e pela sua localização no genoma.

Com este conjunto de 14 *loci* fomos capazes de varrer 11 dos 19 cromossomas da videira, aumentando a resolução de polimorfismos genómicos, comparativamente com o projecto GrapeGen06 e o set da OIV (Figura 2).

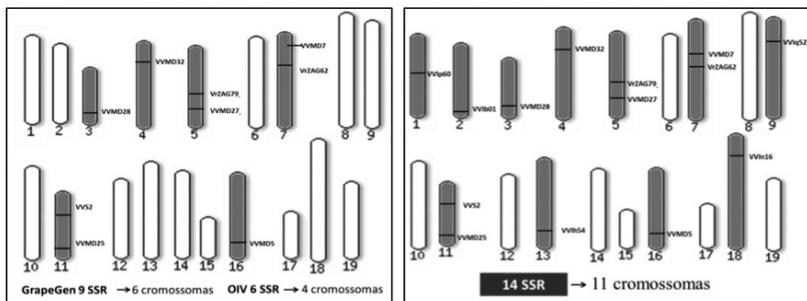


Figura 2- Distribuição dos microssatélites usados no genoma da Videira.

Com este conjunto de 14 SSRs, genotipámos cerca de 400 indivíduos, de um total de 290 castas. Posteriormente, o perfil genético obtido para cada indivíduo foi comparado com outras bases de dados, nomeadamente com a Francesa (Project PlantGrape), Espanhola (SIVVEM), a Vitis International Variety Catalogue (VIVC) e o Consórcio EAN/ITQB/EVN/ISA/UTAD, por forma a validar os resultados. De todos os perfis obtidos, 98% coincidiram com os publicados. Os restantes 2% estão neste momento a ser reanalisados.

3.2- Impacto fisiológico da inserção da TAG RFID

Com o objetivo de avaliar o impacto da inserção da TAG de RFID na fisiologia da videira foram avaliados a evolução do estado fenológico, o abrolhamento, a fertilidade, a área foliar, a densidade do coberto vegetal, a evolução da maturação das uvas e a caracterização quantitativa da vindima.

Relativamente à evolução do estado fenológico, o ensaio foi realizado em 2012, que revelou ser um ano atípico, em consequência dos valores reduzidos de precipitação durante os meses de Inverno. Contudo, a comparação dos estados fenológicos das videiras com e sem TAG não revelou quaisquer alterações, pelo que se conclui que este não impacta na fenologia da videira.

No que diz respeito ao abrolhamento e à fertilidade, mediram-se os valores médios do número de lançamentos, da percentagem de abrolhamento e dos índices de fertilidade potencial e prático das videiras em estudo (com e sem TAG), não tendo sido observadas alterações significativas entre estas (Tabela 1). Similarmente, também não foram detetadas alterações entre estes dois grupos na estrutura do coberto vegetal, nomeadamente na área foliar (Tabela 2), na dimensão da sebe (Tabela 3), e na densidade do coberto (Tabela 4).

Tabela 1- Efeito do chip nas castas Baga e Touriga Nacional no número de lançamentos (NLanc), na percentagem de abrolhamento (%A), no índice de fertilidade potencial (IFPot) e no índice de fertilidade prático (IFPra). Com chip-CC e sem chip-SC. ns- com p value ≥ 0.05

	Modalidade	Nlanc	%abroilh	Indfertprat	Indfertpot	p value
Baga	CC	13,89±3,40	95,80±7,53	1,35±0,33	1,41±0,33	ns
	SC	13,35±3,77	95,41±6,17	1,26±0,51	1,32±0,54	
Touriga Nacional	CC	11,25±1,8	96,97±5,70	1,59±0,25	1,63±0,22	ns
	SC	12,05±2,8	98,3±4,63	1,66±0,23	1,69±0,23	

Tabela 2- Efeito do chip nas castas Baga e Touriga Nacional na área foliar. Legenda: área foliar por sarmento (AF/Sarmento), na área foliar por cepa (AF/Cepa) e na área da folha principal (AF/Principal). Com chip-CC e sem chip-SC. ns- com p value > 0.05 .

	Data	Est.Fenológico	Modalidade	AF/ Sarmento	AF/folha principal	AF/Cepa	p value
Baga	06-Ago	Início pintor	CC	0,25±0,05	197,22±56,31	3,40±0,88	ns
			SC	0,23±0,04	199,46±52,53	2,96±0,81	
Touriga Nacional	06-Ago	Início pintor	CC	0,21±0,04	156,22±29,43	2,21±0,75	ns
			SC	0,20±0,03	146,40±31,19	2,290±0,62	

Relativamente à resposta dos enxertos prontos à inserção da TAG de RFID, todas as videiras sobreviveram à inserção da TAG e o seu desenvolvimento no primeiro ano foi idêntico ao das restantes plantas não marcadas.

Monitorizou-se ainda a evolução da maturação das uvas de videiras com e sem TAG, tendo-se medido o peso dos bagos, o teor em álcool provável, a acidez total e o teor em antocianinas totais (Tabela 5). Uma vez mais não foram detetadas diferenças significativas entre as videiras com e sem a TAG, podendo-se afirmar portanto que este também não impacta na evolução da maturação da uva. Finalmente, foi feita uma análise quantitativa da vindima, com registo do número de cachos por cepa e do peso médio dos cachos, que se revelaram idênticos nos dois grupos de estudo (Tabela 5).

Tabela 3- Efeito do chip nas castas Baga e Touriga Nacional na altura da sebe (Hsebe), largura da base (Lbase), largura da zona de frutificação (Lcachos), largura vegetação (Lvegetal), largura do topo (Ltopo) e na superfície foliar exposta (SFE) em metros. Com chip-CC e sem chip-SC. ns- com p value > 0.05

	Data	Est.Fenológico	Modalidade	Hsebe	Lbase	Lcachos	Lvegetal	Ltopo	SFE	p value
Baga	04-Ago	Início pintor	CC	0,93±0,12	0,57±0,12	0,33±0,07	0,63±0,13	0,53±0,11	2185,31±440,45	ns
			SC	0,91±0,11	0,61±0,12	0,31±0,07	0,64±0,12	0,56±0,08	2253,5±404,35	
	08-Set	Início Maturação	CC	0,94±0,17	0,8±0,00	0,57±0,12	0,61±0,12	0,49±0,09	10086,54±1596,05	ns
			SC	0,9±0,11	0,8±0,00	0,59±0,09	0,64±0,09	0,51±0,12	9880,25±922,85	
Touriga Nacional	03-Ago	Início pintor	CC	1,02±0,12	0,56±0,78	0,29±0,44	0,54±0,82	0,45±0,95	12333,33±1220,20	ns
			SC	0,98±0,08	0,57±0,66	0,28±0,45	0,56±0,96	0,42±0,85	11988,54±8,57	
	07-Set	Início Maturação	CC	0,97±0,11	0,5±0,07	0,28±0,03	0,53±0,06	0,34±0,10	11511,46±959,89	ns
			SC	0,93±0,09	0,54±0,07	0,29±0,04	0,53±0,08	0,35±0,09	11226,04±1116,87	

Tabela 4- Efeito do chip nas castas Baga e Touriga Nacional em relação ao número de camadas de folhas (NCF) e ao número de folhas interiores (NFint). Com Chip-CC e Sem Chip-SC. ns- com *p* value >0.05

	Data	Est. Fenológico	Modalidade	NCF	Nfint	<i>p</i> vaule
Baga	04-Ago	Ínicio pintor	CC	3,17±1,67	1,27±1,38	ns
			SC	3,06±1,48	1,24±1,26	
	08-Set	Ínicio Maturação	CC	2,21±1,49	0,70±1,09	ns
			SC	2,29±1,44	0,79±1,01	
Touriga Nacional	03-Ago	Ínicio pintor	CC	2,60±1,85	1,16±1,34	ns
			SC	2,43±1,69	0,98±1,19	
	07-Set	Ínicio Maturação	CC	0,98±1,01	0,22±0,52	ns
			SC	0,87±1,01	0,17±0,48	

Tabela 5- Efeito do chip nas castas Baga e Touriga Nacional em relação ao pesos dos bagos, teor em álcool provável (TAP), acidez total (Acidez T), taninos, teor em antocianinas totais (Antocian), número cachos por cepa (Nº Cachos) e peso médio dos cachos (Peso Médio/cacho).Com Chip-CC e Sem Chip-SC. ns- com *p* value >0.05.

	Modalidade	Peso Bagos	TAP	AcidezT	Taninos	Antocian	Nº Cachos	Peso Médio/cacho	<i>p</i> value
Baga	CC	277,4±15,25	11,64±1,01	4,83±1,07	123,2±27,53	141,4±10,88	14,8±4,47	88,13±56,63	ns
	SC	273,29±10,07	12,16±0,93	4,72±1,07	123,4±22,56	147,2±9,63	13,00±5,86	113,44±123,03	
Touriga Nacional	CC	194,77±8,29	11,63±0,9	4,33±1,06	252±77,61	95±20,83	17,35±4,36	111,19±79,95	ns
	SC	194,81±7,35	11,08±0,76	4,64±1,21	178,17±67,34	116,67±27,43	18,85±4,31	122,44±75,60	

4-CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos um serviço de genotipagem simples, económico e reprodutível, com base em 14 microssatélites, que pode ser utilizado para identificação de variedades de videira, quer a partir de folhas, quer de varas dormentes, bacelos enxertados ou porta-enxertos, e que se apresenta como uma ferramenta promissora para o controlo de identidade do material vegetativo.

Os resultados obtidos evidenciaram que a presença de TAGs RFID na planta não provocou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros estudados, ainda que isso possa dever-se ao facto de serem os primeiros dados colhidos após introdução destas. Sendo uma tecnologia muito versátil, é capaz de revolucionar o mercado, por melhorar muito a gestão de certos sectores pelo facto de apresentar como vantagens a capacidade de armazenamento, leitura e envio de dados. Apresenta, também, precisão nas informações e velocidade de envio. Um dos entraves à sua maior divulgação reside no seu elevado custo. Contudo, num futuro próximo e com os avanços tecnológicos, a sua implementação poderá ser mais convidativa, permitindo preços mais acessíveis e com uma eficácia similar.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto InovWine financiado pelo FEDER, através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE, e “Quadro de Referência Estratégico Nacional” – QREN, com a referência FCOMP-01-0202-FEDER-011498.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWERS J., Dangl G., Meredith C. 1999 Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic* 50:243-246.
- BRAGA R., *et al* Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2009. Viticultura de Precisão. Lisboa. 1a edição. Produção apoiada pelo Programa AGRO – Medida 7 – Formação Profissional, co-financiado pelo Estado Português e pela União Europeia através do FSE. Projecto no 3431144. Disponível em: <http://www.agrinov.ajap.pt>.
- CARIMI F., Mercati F., Michele R., Fiore M., Riccardi P., Sunseri F. 2011 Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar ‘Nero d’Avola’ as revealed by microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 58:967-975.
- GUICHOUX E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., e Petit R.J. 2011 Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecology Resources* 11: 591–611.
- LIN H., Walker M. 1997 Extracting DNA cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *Hort Sci* 32: 1264-1266.
- LUVISI A., Triolo E., Rinaldelli E., Bandinelli R., Pagano M., Gini B. 2010 Radiofrequency applications in grapevine: from vineyard to web. *Computers and Electronics in Agriculture* 70:256-259.
- MERDINOGLU D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F., Decroocq S. 2005 Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol Breed* 15:349-366.
- O.I.V. 2009: 2ª Edición de la lista de descriptores OIV para variedades de vid y especies de Vitis. Eds. O.I.V., Paris.

THE EFFECT OF WINE COMPOSITION ON *DEKKERA BRUXELLENSIS* GROWTH AND VOLATILE PHENOL PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY APPROACH

Mahesh CHANDRA^{1,*}; André BARATA¹; Suzana FERREIRA-DIAS²; Manuel MALFEITO-FERREIRA¹ and Virgilio LOUREIRO¹

Abstract

The present study aimed at determining the effect of glucose, alcohol and sulfur dioxide on the growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* using a central composite rotatable design (CCRD). Sulfur dioxide fraction proved to have a significant ($p < 0.05$) negative linear and quadric effect on growth and 4-ethyl production. Higher level of sulfur dioxide showed immediate effect on cell death. On the other hand, under elevated ethanol concentrations, a long delay in lag phase was observed. The cells that could overcome ethanol toxicity, showed further growth but no 4-ethyl phenol production. No direct relation between 4-ethyl phenol production and consumed glucose was observed. Furthermore, when cells were inactivated by sulfur dioxide and ethanol, glucose didn't increase wine susceptibility to spoilage by *D. bruxellensis* growth.

Key-words: wine, cell death, yeasts, *Dekkera bruxellensis*, volatile phenol

INTRODUCTION

The production of volatile phenols defines the importance of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts during winemaking and has been well documented (CHATONNET et al., 1992; CHATONNET et al., 1995; MALFEITO-FERREIRA, 2011; SUÁREZ et al., 2007). These volatile phenols, especially the ethyl phenols, are responsible for off-odours and are detrimental to the aroma profile of wines at high concentrations (CHATONNET et al., 1995; SUÁREZ et al., 2007). However, the conditions under which volatile phenols are produced in wine and the exact mechanisms involved are not fully understood. Some

1. Technical University of Lisbon, Instituto Superior de Agronomia, Centro de Botânica Aplicada à Agricultura, Laboratório de Microbiologia, Lisbon 1349-017, Portugal.

2. Technical University of Lisbon, Instituto Superior de Agronomia, CEER, Biosystems Engineering, Lisbon 1349-017, Portugal

* Corresponding author: email: mchandra@isa.utl.pt

of the factors/constituents present in wine medium e.g. sulfur, ethanol, pH, sugar and presence of oxygen are reported to play a key role in the cell growth and consequently in 4-ethyl phenol production (BARATA et al., 2008a; BARATA et al., 2008b; CIANI et al., 2003). Sulfur dioxide is the main preservative in wines and *B. bruxellensis* has been regarded as either resistant or sensitive (LOUREIRO and MALFEITO-Ferreira, 2006). Some authors refer its sensitivity to sulfite higher than 30 mg L⁻¹ (CHATONNET et al., 1992; GERBAUX et al., 2002), explaining its frequent isolation from sulfur unprotected wine (HERESZTYN, 1986). On the other hand, others have been reported its survival under more than 30 mg L⁻¹ of free sulfite (Froudière and Larue, 1988). This apparent controversy occurs in absence of studies under comparable situations. In fact, sulfite resistance was studied in low ethanol wines of 9.5% (GAIA, 1987) or 11.3% ethanol (Froudière and Larue, 1988). Our previous results point out that ethanol is a major factor determining sulfite resistance (MALFEITO-Ferreira et al., 2004). This controversy, however, does not lie in the free form of SO₂ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). However, it should be kept in mind that free state is completely dependent on several compounds especially the carbonyl groups that have affinity to sulfur to bind. Noteworthy, binding is related to the chemical dissociation constant *K*, which follows the simple rule i.e., lower the *K* value, higher the affinity. Among the molecules present in wine, glucose has the highest *K* value while ethanal (acetaldehyde) has the lowest. Moreover, the ionization constant (p*K*) of sulfur is affected by the ethanol concentration, the presence of sugars and temperature (USSEGLIO-TOMASSET, 1995). Therefore, the present study is aimed at understanding the interaction among three factors: sulfur, sugar and ethanol, and finding the detrimental concentration of them that negatively affect *D. bruxellensis* growth in wine and consequently the 4-ethyl phenol production. Response Surface Methodology (RSM) was used for modelling growth and 4-ethyl phenol production. With RSM, several variables are tested simultaneously with a minimum number of trials, according to special experimental designs, which enables to find interactions between variables (GACULA and SINGH, 1984; MONTGOMERY, 1991).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Yeast strain and its maintenance

The strain *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 was isolated in our laboratory from a phenolic tainted red wine and was maintained in GYP medium (20 g/L glucose (Merck, Darmstadt, Germany), 5 g/L yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, USA), 10 g/L peptone (Difco) and 20 g/L agar, pH 6.0).

2.2. Inoculum preparation

B. bruxellensis ISA 2211 inoculum was prepared by previous growth in 100 mL of Yeast

nitrogen broth (6.7 g/L YNB with 10% ethanol, adjusted to $\text{pH } 3.50 \pm 0.01$ and sterilized by membrane filtration (0.22 μm pore size), incubated at 25 °C with orbital shaking (120 rpm). Experimental wine was obtained by blending several commercial red wines followed by filtration through membranes of 0.22 μm pore size. Incubation was carried out at 25°C and cellular culturability was measured by plating onto GYP agar.

2.3. Chemical analysis

The 4-ethylphenol production was measured according to a protocol described by Bertrand (1981). A GC-FID (Varian CP-3800) series with a capillary column from FactorFour (ID, 0.25 mm; length 15.0 m; film, 0.25 μm) was used. The concentrations of sugars, acids and alcohols were assessed by HPLC using a flow rate of 0.6 mL/min of an aqueous solution of 2.5 mM H_2SO_4 (mobile phase). The separation was performed in a size-exclusion and ion-exchange column (8.0 x 300 mm, SH1011, Shodex) at 60 °C. The quantification and integration was done using refractive index detector (Waters 2410) and chromatography data software Empower-2, respectively.

2.4. Experimental design and statistical analysis

The influence of three factors viz., sugar, ethanol and sulfur was studied using a central composite rotatable design (CCRD). The results of the 17 treatments were analyzed using the software “Statistica™”, version 7, from Statsoft, Tulsa, USA. The linear (L) and quadratic (Q) effects of these factors, as well as their linear interactions, were calculated and their significance was evaluated by analysis of variance. A four-dimensional surface, described by a first- or a second-order polynomial equation was fitted to each set of experimental data points. First- and second-order coefficients were generated by regression analysis. The fit of the models was evaluated by the determination coefficients (R^2) and adjusted R^2 (R_{adj}^2) (WEISBERG, 1985).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table-1 shows the polynomial equations of the surface responses fitted to experimental data points. The significant effects ($P < 0.05$) and those having a confidence range smaller than the value of the effect, or smaller than the standard deviation were included in these model equations (data not shown). Thus, among all three tested factors, sulfur showed to have the most significant effect on immediate death activation which was mathematically confirmed by its negative linear effect on culturable cell's population observed on 2nd day of inoculation. Moreover, a second order polynomial model, established via CCRD, is well adjusted to the experimental data points (Table-1).

Table-1. Model equations describing the response surfaces fitted to the CCRD experimental data points, growth (CFU) and 4-ethyl production (4-EP) of *B. bruxellensis*, as a function of the concentration of glucose (G), ethanol (E) and sulfur (S) and respective R² and R²_{adj}.

Response parameter	Model equation	R ²	R ² _{adj}
CFU 2 days	$7.34 - 0.365(S)+0.005(S)^2$	0.809	0.780
CFU 5 days	$8.235-0.502(S)+0.0082(S)^2$	0.893	0.878
CFU 30 days	$15.38 - 1.69(G)+0.125(G)^2 - 0.132(E) - 0.482(S) + 0.0074(S)^2$	0.872	0.813
4-EP 30 days	$1991.51-692.28(G)+52.34(G)^2+286.28(E)-115.15+4.172(S)^2-10.59$	0.938	0.901

G= glucose (g L⁻¹); E= ethanol (% v/v); S = sulfur dioxide (mg L⁻¹)

The response surface plots of the cell growth as a function of sulfur and glucose (Fig. 1), illustrates the dominant contribution of quadratic effect of sulfur to the model, showing that increase in sulfur content promoted decrease in *D. bruxellensis* population size. Furthermore, until the end of experiment, death activation and consequently 4-ethyl phenol production was found to be significantly dependent on the amount of sulfur (linear and quadratic effects), which was observed in the obtained concave surface (Fig. 2).

In most of the cases, where SO₂ exposure was above 20 mg/L, cells showed sharp death. While, at equal or below sulfur concentrations of 20 mg/L (low SO₂ exposure), cells initially showed dramatic death phase, which after some period of time, started to show viability when cultured on media plates. This observation is indicative of the yeast entering the so-called physiological state of “viable-but-not culturable” or VBNC, characterized by inability of the cells to divide on culture media, even though they are still alive and maintain their metabolic or cellular activity (MILLET and LONVAUD-FUNEL, 2000). Sulfur dioxide has been shown to induce the state of VBNC in the wine spoilage yeast *Brettanomyces* (AGNOLUCCI et al., 2010; DU TOIT et al., 2005; SERPAGGI et al., 2012).

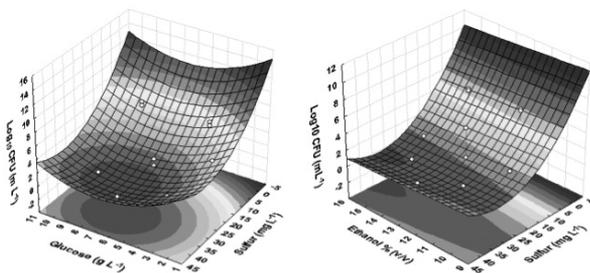


Figure 1. Response surface fitted to the cell growth as a function of glucose, ethanol and sulfur dioxide, on 30th day after inoculation in red wine trials.

Glucose showed its positive linear effect on cell growth as well as on 4-ethyl phenol production under low ethanol and/or sulfur conditions. Since 4-ethylphenol production rate was linked to the biomass attained, therefore sugar consumption and 4-EP synthesis have no direct relation with each other. If there is any relation between the two, is only due to increase of cell biomass (especially in low ethanol conditions) which consequently leads to increased 4-EP production in total. However, it should be kept in mind that glucose has an affinity to bind with sulfur (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Though, equilibrium constant for the formation of the addition product with glucose is small, in sweet wines as the concentration is high, it can be significant. DIAS et al. (2003) showed that in the absence of carbon sources there is no production of 4-ethylphenol. However, these results were obtained in synthetic media and were not validated for wines (as complete absence of carbon source in wine is near to impossible!). In dry wines, residual sugars are below 2 g/L, but this small amount is enough to support volatile phenol production (LOUREIRO and MALFEITO-FERREIRA, 2006).

Elevated level of ethanol caused a long delay in lag phase. It was observed that the lag phase constituted a far shorter period i.e., 3 days at lower ethanol (11% and 12.5%) exposure than that of higher concentration (14%), pertaining 10 days. Interestingly, at 15% ethanol level, which is considered the limit for *D. bruxellensis* growth, there were still very few countable numbers of culturable cells. Noteworthy, in case of sulfur exposure, cells entered the VBNC state but 4-ethyl phenol production still continued; while, in case of elevated ethanol exposure, some cells managed to show culturability but production of 4-ethyl phenol ceased. Lack of 4-EP production in growing cells highlights the observations of BENITO et al. (2009), where cessation of the two key enzymes for HCA conversion into 4-EP i.e., phenolic acid decarboxylase (PAD) and vinyl phenol reductase (VPR), at high ethanol concentration, has been reported. Therefore, wine containing low sulfite doses of SO₂, if accompanied with high ethanol levels, would be better protected from the spoilage yeast, *D. bruxellensis*. Of course, to elucidate this

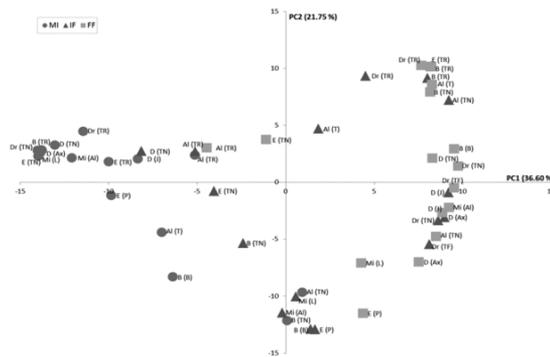


Figura 3: Análise por Componentes Principais da comunidade microbiana ao longo do MI, IF e FF para as diferentes regiões vinícolas portuguesas, baseado no número de seqüências.

phenomenon, physiological state of cell after exposure of sulfur and ethanol need to be further investigated at a proteomic and molecular levels with due attention to enzymes kinetics involved in energy metabolism.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors wish to thank FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) for financial support for Project SFRH/BPD/70888/2010.

REFERENCES

- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., and Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int J Food Microbiol* *143*, 76-80.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2008a). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int J Food Microbiol* *121*, 201-207.
- Barata, A., Pagliara, D., Piccinino, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2008b). The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *Fems Yeast Res* *8*, 1097-1102.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., and Suárez-Lepe, J. A. (2009). Factors Affecting the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase Activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* Control in Red Wine Making. *Journal of Food Science* *74*, M15-M22.
- Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cour de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualite du vin. In Séances du Colloque Societé Française de Microbiologie, (Reims), pp. 251-267.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-n., and Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *60*, 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. N. (1995). The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am J Enol Viticult* *46*, 463-468.
- Ciani, M., Maccarelli, F., and Faticenti, F. (2003). Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* *19*, 419-422.
- Coulon, J., Perello, M. C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., and Renouf, V. (2010). *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *J Appl Microbiol* *108*, 1450-1458.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2003). Factors

- affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol* 20, 377-384.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J Appl Microbiol* 98, 862-871.
- Froudière, I., and Larue, F. (1988). Condition de survie de *Brettanomyces (Dekkera)* dans le mout de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 2, 296-303.
- Gacula, J., and Singh, J. (1984). Response surface designs and analysis, in: , (New York: Academic Press).
- Gaia, P. (1987). Caraterizzazione tassonomica ed enologica de lieviti anomali fonte di inquinamento dei vini. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti* 18, 290-305.
- Gerbaux, V., Vincent, B., and Bertrand, A. (2002). Influence of Maceration Temperature and Enzymes on the Content of Volatile Phenols in Pinot noir Wines. *Am J Enol Viticult* 53, 131-137.
- Heresztyn, T. (1986). Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology* 146, 96-98.
- Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2006). Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. In *Food Spoilage Microorganisms*, C. Blackburn, ed. (Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited), pp. 354-398.
- Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Ann Microbiol* 61, 95-102.
- Malfeito-Ferreira, M., Barata, A., Nobre, A., Tavares, M., Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Gonçalves, G., Rodrigues, N., and Loureiro, V. (2004). Behavior of *Brettanomyces bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* in wines. Paper presented at: ASEV 55th Annual Meeting (San Diego, California).
- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136-141.
- Montgomery, D. C. (1991). Design and Analysis of Experiments. In, (New York: Wiley), p. 649.
- Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology. In *Handbook of Enology*, (West Sussex, England: Wiley and Sons Ltd), pp. 193-216.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol* 30, 438-447.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., and Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- Usseglio-Tomasset, L. (1995). Chimie oenologique. In, (Paris: Tec and Doc Lavoisier).
- Weisberg, S. (1985). Applied Linear Regression 2nd edn edn (New York, NY: Wiley).

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS MEDIATED TRANSFORMATION OF GRAPE FUNGAL PATHOGENS AS A TOOL TO STUDY THE MECHANISMS OF PATHOGENICITY

María CARBÚ; Victoria Eugenia GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ; Carlos GARRIDO; and Jesús Manuel CANTORAL

Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Puerto Real (Cádiz, Spain). C.P.: 11510. E-mail: maria.carbu@uca.es; jesusmanuel.cantoral@uca.es

1 - ABSTRACT

The vine is a plant affected by a wide variety of fungi, which can affect both the green parts like bunches of grapes, causing damage to the quality and quantity of grapes produced. A better understanding of the mechanisms of pathogenicity using by these fungi is needed to develop novel strategies for the effective management of the diseases.

Agrobacterium tumefaciens - mediated transformation (ATMT) of fungi has become a common technique for the study of a wide variety of different fungal species over the past 13 years. The possibility of performing the fungal transformation using *A. tumefaciens* provides an efficient tool for those fungi that are difficult to transform by traditional methods. Because of the efficiency of transformation process, it is relatively easy to generate a large number of stable transformants. The application of this method to study phytopathogenic fungi of the vine will enable us the analysis of genes involved in their mechanisms of pathogenicity.

2 – KEYWORDS

Agrobacterium tumefaciens mediated transformation; ATMT; Fungi; *Botrytis cinerea*; *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*

3 – MAIN TEXT

Agrobacterium tumefaciens is a soil bacterium that causes crown galls to plants by transferring part of a tumour-inducing plasmid DNA into their genome. It has the natural ability to transfer a segment of DNA from its Ti plasmid, known as the “T-DNA”, into plant or fungal cells so that T-DNA integrates at random into the nuclear chromosomes. The ends of the T-DNA, and thus the length of the transferred DNA, are defined by two short repeated sequences, known as the left and right borders, and they are essential to the integration of that DNA fragment into the host genome. This process of T-DNA transfer is dependent upon expression of *A. tumefaciens* `vir` gene, which are induced by compounds secreted by wounded plant cells, such as acetosyringone (AS).

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT) has recently been used for transfer foreign DNA to other organisms such as yeast (Piers *et al.* 1996), plant pathogenic fungi (Covert *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2008), human and animal pathogenic fungi (Sullivan *et al.* 2002), mushrooms (Chen *et al.* 2000), biocontrol fungi (Li *et al.* 2005) and human cells (Kunik *et al.* 2001). The principal advantages of ATMT over conventional transformation techniques are the higher transformation efficiency, the frequency of single-copy integrations, the creation of fewer untagged mutations (Michielse *et al.* 2005; Weld *et al.* 2006), the ease of protocol, the facility with which T-DNA-tagged mutated genes or flanking sequences can be identified (Karunakaran *et al.* 2008) and the versatility it provides in choosing which starting material to transform, due to the fact that *Agrobacterium* can transform protoplasts, hyphae, spores, conidia, and even blocks of mushroom mycelial tissue (Chen *et al.* 2000; de Groot *et al.* 1998; Xu *et al.* 2005). ATMT can be used to produce targeted gene disruptions and random insertional mutations, becoming a powerful tool for the functional characterization of genes and the analysis of fungal biology.

Fungi such *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., among others, are able to affect the vine, causing damage to both the green parts of the plants (shoots, inflorescences, branches) and bunches of grapes. The interference produced by these fungi invasions causes a decrease in the quantity of grapes produced and several alterations in the quality of the must and wine obtained, i.e. increasing the level of gluconic acid, glycerine and ochratoxin A. The functional analysis of fungal genomes, especially in the case of phytopathogenic fungi for which

genes involved in pathogenicity are not completely known, allows us to determine their mechanisms of infection. This goal can be achieved by using random mutagenesis methods such as *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Therefore the purpose of this study was to optimize and develop an efficient ATMT protocol for *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus carbonarius*, which allows us to obtain a highly efficient transformation and gene disruption these phytopathogenic fungi. Molecular characterization of those mutants affected in pathogenicity will allow us to highlight the mechanisms of infection of these pathogenic fungi of vine.

The development of an efficient ATMT protocol requires the optimization of several parameters. These parameters include the nature of the fungal starting material, the *Agrobacterium* strain, the fungal isolate used, the acetosyringone concentration, the sensitivity to the antibiotic hygromycin B and the selection of co-cultivation conditions (Michielse *et al.* 2005). The fungal strains chosen were *Botrytis cinerea* B0510, *Alternaria alternata* Aa1 and *Aspergillus carbonarius* CECT2086, which were grown on potato dextrose agar between 10 and 15 days at 25°C in continuous light to promote conidiation. *A. tumefaciens* strain AGL-1 carrying the binary plasmid vector pMDC32rc was used for transform conidia of these three fungal strains.

Many studies have shown that the addition of acetosyringone is required for the induction of the *vir* gene and therefore play an important role for transferring T-DNA. The effect of acetosyringone during pre-culture of *A. tumefaciens* seemed variable according to fungal species. In fungal species such, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum falcatum* and *Colletotrichum acutatum*, acetosyringone increased the transformation efficiency, whereas in *Hebeloma cylindrosporum* and *Colletotrichum trifolii* did not (Karunakaran *et al.* 2008; Michielse *et al.* 2005). Leclerque *et al.* (2003) investigated the effect of acetosyringone concentration during *Agrobacterium* pre-culture, and during co-cultivation. They concluded that an acetosyringone concentration up to 500µM increased the number of transformants of *Beauveria bassiana*. In our study, we have examined the transformation efficiency in presence and absence of acetosyringone, during *Agrobacterium* pre-culture and during co-cultivation. Addition of acetosyringone prior to co-cultivation increased the number of transformants, being optimal acetosyringone concentration of 200µM.

Other important factors, determining the efficiency of ATMT, are the co-cultivation conditions. These include the concentration of *A. tumefaciens* and fungal recipient, temperature, pH, length of the co-cultivation time and filters type. During the design of our experimental setup, we optimized the concentration of the fungus as well as filters type. The concentration of the fungus is important because the addition of too many fungal recipients can result in too much fungal growth during co-cultivation, which makes the subsequent isolation of single transformants difficult (Covert *et al.* 2001). Based on these previous findings, conidia of each strain were collected and resuspended in water and their concentration adjusted to $10^3 - 10^8$ conidia ml^{-1} . The conidial suspension was mixed with an equal volume of *A. tumefaciens* culture, prepared as described by Covert *et al.* (2001). A 200 μl aliquot of this mixture was plated on induction medium (IM) amended with 200 μM acetosyringone. The greatest number of transformants was collected from experiments in which the number of conidia co-cultured with *A. tumefaciens* was 10^4 or 10^5 /plate. Other concentration of conidia either yielded no transformant (i. e. 10^3 / plate) or too much fungal growth to identify transformant colonies (i.e. 10^6 /plate or higher). As for the type of filter that can be used in the co-cultivation step, previous studies have employed nitrocellulose, Hybond N⁺, filter paper, cellophane sheets polyvinylidene difluoride (Michielse *et al.* 2005). The experiments were carried out by testing the efficiency of transformation by co-incubation on nitrocellulose filter with 0.45 μm pores (Whatman) or Hybond N⁺ (Amersham International). It was found that both types of filters resulted in equally high transformation rates.

The last parameter that it was necessary to optimize was the level of sensitivity of the fungi to hygromycin B. *B. cinerea* B0510, *A. alternata* Aa1 and *A. carbonarius* CECT2086 strains were tested for hygromycin B sensitivity using different concentrations from 50 – 500 $\mu\text{g/ml}$. Freshly grown mycelial edges were transferred to potato dextrose agar amended with hygromycin B, and the optimal concentration was determined by each fungal species.

Once optimized main parameters that can affect the efficiency of transformation, we have carried out the *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of *B. cinerea*, *A. alternata* and *A. carbonarius* using the protocol described by de Yan *et al.* (2010) with the subsequently modifications. *A. tumefaciens* strain AGL-1 was grown at 28 °C for 2 days in minimal medium (MM) supplemented with kanamycin (100 $\mu\text{g/ml}$). The

A. tumefaciens cells were diluted to an optical density ($OD_{600} = 0.15$) in induction medium (IM) with (IM+AS) or without (IM-AS) acetosyringone ($200\mu\text{M}$). Subsequently, the bacterial cells were grown for an additional 6h before mixing them with an equal volume of conidial suspensions of fungus (10^4 conidia ml^{-1}). A $200\mu\text{l}$ sample of the mixture was sprayed onto nitrocellulose filter ($0.45\mu\text{m}$ pore and 45mm diameter, Whatman), plated on IM amended with $200\mu\text{M}$ AS and without AS and incubated at 20°C in the dark.

Following co-cultivation for 24, 36 and 48 h at 20°C the membrane was cut into small pieces ($3 \times 0.1\text{ cm}$), and transferred upside-down on PDA plates supplemented with hygromycin B as a selection agent for fungal transformants and cefotaxime ($200\mu\text{M}$) to kill the *A. tumefaciens* cells. After 5-7 days at 24°C , individual transformants were transferred onto PDA plates amended with hygromycin B. To create monoconidial transformants, a single germinating conidium from each transformant was picked with a sterile needle and transferred to small PDA plates containing hygromycin B and cefotaxime. Transformants were plated on fresh selective medium four times. Conidia from these monoconidial cultures of hygromycin B resistant transformants were stored in 30% glycerol at -80°C until further analysis.

Once applied the ATMT protocol to the three genera of fungi appeared putative transformants on the selective plates. These transformants seemed as different colonies against a background of dead untransformed colonies. In experiments, in which *Agrobacterium* without AS was used for transformation, putative transformants appeared after a delay of 2 weeks, and they were substantially less in number. Individual transformed colonies were picked and grown on hygromycin B for four rounds of selection. Those transformants that maintained their resistance to hygromycin B after four sub-cultures were classified as mitotically stable. These transformants were selected and grown for conidiation and then monoconidial purification of them.

Our success in the ATMT of *B. cinerea* or *A. alternata* or *A. carbonarius* is an additional, independent confirmation of the efficiency of the method for transformation of filamentous fungi. This technique is relatively simple, efficient, and reproducible, and offers an opportunity to study the molecular genetics of these fungi and molecular basis of their pathogenicity on vine.

4 –REFERENCES

- Chen, X., Stone, M., Schlagnhauser, C., Romaine, G.P. (2000) Afruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*- mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Applied and environmental Microbiology 66: 4510-4513.
- Covert, S.F., Kapoor, P., Lee, M.H.; Briely, A., Nairn, C.J. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology 16:839-842.
- Karunakaran, M., Nair, V., Rho, H.S., Choi, J., Kim, S., Lee, Y.H. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. J. Microbiology Biotechnology 18:234-241.
- Kunik, T., Tzfira, T., apulnik, Y., Gafini, Y., Dingwall, C., Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 1871-1876.
- Leclerque, A., Wan, H., Abschutz, A., Chen, S., Mitina, G.V. Zimmermann, G., Schairer, H.U. (2003). *Agrobacterium*- mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Current Genetic 45: 111-119.
- Li, M.X., Gong, X.Y., Zheng, J., Jian, D.H., Fu, Y.P., Hou, M.S. (2005). Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiology Letters 243: 323-329.
- Michiels, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C., Ram, A.F.J. (2005). *Agrobacterium*- mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetic 48: 1-17.
- Piers, K.L., Heath, J.D., Liang, X.Y., Stephens, K.M., Nester, E.W. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 1613-1618.
- Sullivan, T.D., Rooney, P.J., Klein, B.S. (2002). *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. Eukaryotic Cell 1: 895-905.
- Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Res. 16: 31-44.
- Xu, W., Zhu, C., Zhu, B. (2005). An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal Microbiology Biotechnology 15: 683-688.
- Yan, L., Yang, Q., Sundin G.W., Li, H., Ma, Z. (2010). The mitogen-activated protein kinase BOS5 is involved in regulating vegetative differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*. Fungal Genetics and Biology 47: 753-760.
- Zhang, P., Xu, B., Wang, Y., Li, Y., Qian, Z., Tang, S., Huan, S., Ren, S. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii*. Mycological Research 112: 943-949.

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE PRESENTE NO MICROBIOMA DA VINHA

Cátia PINTO¹; Valéria CUSTÓDIO¹; Susana SOUSA¹ e Ana Catarina GOMES*¹

RESUMO

A videira (*Vitis vinifera*) é naturalmente colonizada por uma grande variedade de microrganismos, tanto microrganismos benéficos como patogénicos, que interagem com a planta e apresentam um papel importante no seu crescimento, vigor e na qualidade das suas uvas. Neste estudo, efetuamos uma caracterização extensiva do microbioma natural da videira durante o seu ciclo vegetativo através de uma abordagem de metagenómica.

Esta análise revelou uma grande biodiversidade, um microbioma complexo associado naturalmente com a videira e foi observado um equilíbrio entre microrganismos fitopatogénicos e benéficos. Este equilíbrio é extremamente importante para garantir o estado fitossanitário da videira, performance da planta e qualidade do vinho. Adicionalmente, este estudo permitiu também inferir acerca das interações estabelecidas entre planta e as comunidades microbianas.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, microbioma, pirosequenciação biodiversidade estrutural e funcional, microrganismos fitopatogénicos e benéficos

1-INTRODUÇÃO

A VIDEIRA (*Vitis vinifera*) é uma das culturas mais produzidas a nível mundial, apresentando grande relevo económico. A *V. vinifera* é naturalmente colonizada por um complexo ecossistema microbiano constituído por microrganismos benéficos, neutros e fitopatogénicos que interagem entre si e com a planta. Além disso, e após a recolha das uvas, o microecossistema é transferido para o mosto vínico impactando na produção do vinho. Contudo, a estrutura e dinâmica deste complexo ecossistema é ainda desconhecida.

¹ Unidade de Genómica, Biocant – Associação de Transferência de Tecnologia
Parque Tecnológico de Cantanhede, Núcleo 04, Lote 3,
3060-197 Cantanhede, Portugal
email:*acgomes@biocant.pt

A videira pode ser colonizada por microrganismos com efeitos benéficos, que inclusivamente são considerados como sendo agentes naturais de controlo biológico devido à sua capacidade de proteger a planta contra o ataque por microrganismos fitopatogéneos e a capacidade de reforçar as defesas naturais da planta (COMPANT *et al.*, 2005). Contrariamente a estes microrganismos, a videira é suscetível ao ataque de microrganismos fitopatogénicos nomeadamente, fungos, vírus, fitoplasmas e bactérias (LAIMER *et al.*, 2009), que impactam negativamente na vitalidade e nas propriedades fisiológicas normais da planta (FERREIRA *et al.*, 2004), contribuindo para a diminuição do rendimento e qualidade dos produtos produzidos. Neste sentido, o equilíbrio estabelecido entre as comunidades microbianas é fundamental e importante para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas embora, pouco se sabe acerca da magnitude e variabilidade destas populações em condições naturais (SHARPTON *et al.*, 2011).

O objetivo deste estudo é explorar a comunidade microbiana presente naturalmente na videira durante o seu ciclo vegetativo e analisar as interações estabelecidas entre os microrganismos benéficos e fitopatogénicos. Para a análise molecular do microbioma da videira, foi aplicada uma abordagem metagenómica com base na sequenciação do rADN de todos os microrganismos presentes nas folhas de videira através da plataforma de pirosequenciação 454 (454 Life Sciences, Roche, EUA).

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostragem e extração do ADN

As folhas de videira da casta Tinta Roriz foram recolhidas numa vinha localizada na região da Bairrada durante o período de Maio a Julho do ano de 2010. Foram recolhidas um total de 50 folhas que foram posteriormente sujeitas a extração do ADN por utilização do kit QIAmp® DNA stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2- Pirosequenciação e análise dos dados

O ADN de cada amostra foi sujeito a amplificação por PCR para a região V6 do rADN presente no 16S para análise da população procariota (SOGIN *et al.*, 2006) e para as regiões ITS2 e D2 para análise do rADN da população eucariota (WHITE *et al.*, 1990).

Ambas as regiões eucariotas e procariotas foram amplificadas com *primers* que contêm sequências adaptadoras específicas para a plataforma 454 da Life Sciences (A e B), uma sequência *barcode* com 8 nucleótidos e o *primer* universal respectivo. Cada amplificação de PCR ocorreu numa mistura de reação de 30µL que continha o tampão de reação 1x (USB, Affymetrix), 0.2mM de MgCl₂ (USB, Affymetrix), 0.2mM dNTPs (Bioron), 2µL de ADN, 1U de FidelityTaq DNA polymerase (USB, Affymetrix) e 0.4µM dos *primers* específicos para a amplificação dos microrganismos eucariotas e 0.8µM dos *primers* específicos para a amplificação dos microrganismos procariotas. As condições de amplificação consistiram num passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 min seguidos de 25 ciclos sob as seguintes condições 94°C 35s, 50°C 35s e 68°C 40s. Foi ainda aplicada uma extensão final de 5 min a 68°C. A amplificação dos produtos de PCR foi avaliada por electroforese capilar no HT DNA 5000 SE30 Chip para o Lab-Chip90 (Caliper LifeSciences, EUA) e posteriormente purificados com o kit High Pure 96 UF Cleanup Plates (Roche). A qualidade e quantidade de cada produto de PCR purificado foi analisada num leitor de fluorescência através da utilização do kit de quantificação PicoGreen® ds DNA (Invitrogen, EUA). As amostras foram misturadas de acordo com o número de moléculas de ADN, em concentrações equimolares e submetidas para pirosequenciação usando a plataforma GS FLX Titanium (454 Life Sciences, Roche, EUA) do Biocant (Cantanhede, Portugal).

Os dados obtidos foram analisados automaticamente através de uma *pipeline* implementada na Unidade de Bioinformática do Biocant. Todas as sequências foram agrupadas de acordo com as sequências alvo e as regiões sequenciadas (V6, ITS2 e D2). Seguidamente foram aplicados filtros de qualidade e as sequências que (i) continham menos do que 120 nucleótidos, (ii) mais do que dois nucleótidos indeterminados, (iii) sequências com mais de 50% de dissimulação e (iv) sequências contendo quimeras foram rejeitadas (SOGIN *et al.*, 2006). As sequências foram agrupadas de acordo com as suas distâncias filogenéticas de 0.03 (SHARPTON *et al.*, 2011) e agrupadas em unidades taxonómicas operacionais (OTU *Operational Taxonomic Units*). O alinhamento das sequências para identificação dos microrganismos foi realizado em base de dados curadas nomeadamente, na *Ribosomal Database Project II* (RDP) para identificação dos microrganismos procariotas e na plataforma *nt@ncbi/SILVA* para identificação da população eucariota.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Análise geral da biodiversidade microbiana da videira

Neste trabalho estudámos a comunidade microbiana da videira utilizando uma abordagem metagenómica, em que efetuámos a sequenciação paralela e massiva do ADN da população microbiana presente na videira.

A sequenciação do rADN das folhas de videiras gerou um total de 139,034 sequências com elevada qualidade. Estas sequências foram agrupadas de acordo com a sua proximidade filogenética, e sequências com semelhança superior a 97% foram consideradas como formando uma única unidade taxonómica operacional (OTUs). No total, foram obtidos uma média de 97 OTUs para a população eucariota e 124 para a população procariota. Ou seja, no total detetou-se a presença potencial de 97 e 124 espécies de fungus/leveduras e bactérias, respetivamente. Para cada amostra, foi ainda determinada a população esperada (Chao1) e, para a população eucariota, o número esperado de microrganismos foi de 179 ± 17 e para a população procariota 203 ± 15 . Desta forma, podemos afirmar que durante um ciclo vegetativo a videira terá uma biodiversidade estimada de 382 espécies de microrganismos, sendo que esta é uma população dinâmica com flutuações temporais.

3.2- Microbioma da casta Tinta Roriz

A análise do microbioma da casta Tinta Roriz evidenciou uma elevada biodiversidade microbiana, tendo sido identificados microrganismos benéficos e fitopatogénicos. Durante o ciclo vegetativo, foi observado um declínio da população eucariota e um aumento da população procariota. Esta dinâmica é explicada através da aplicação dos tratamentos químicos efetuados na vinha e que são direcionados para minimizar os efeitos de determinados microrganismos fitopatogénicos alvo, a maioria dos quais eucariotas.

Relativamente à população eucariota identificada nesta casta, os microrganismos do filo Ascomycota são os mais abundantes (30.74%), seguidos por *early diverging fungal lineages* (42.88%). Foram ainda observados microrganismos pertencentes ao filo Basidiomycota (2.21%), um grupo designado por “outros” (0.09%) e que contém os filamentos

Chytridiomycota, *Basal fungal lineages*, Blastocladiomycota e Rozella. De realçar que 24.09% dos microrganismos detetados foram classificados como desconhecidos, ou seja, as sequências obtidas não foram atribuídas a qualquer microrganismo aquando do BLAST nas bases de dados utilizadas (Figura 1a). Relativamente à população procariota, os filós Proteobacteria (54.17%) e Firmicutes (40.41%) foram os mais abundantes no entanto, foi ainda observado o filo Actinobacteria (4.24%) (Figura 1b).

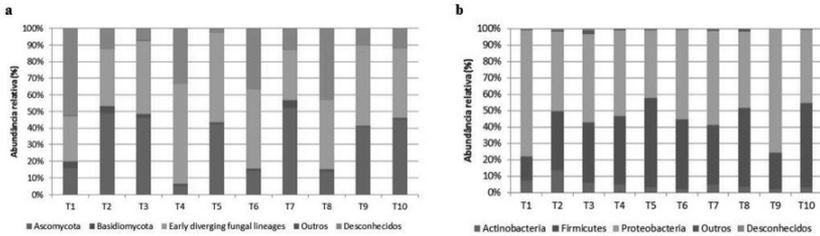


Figura 1: Distribuição da comunidade microbiana ao longo do ciclo vegetativo da videira. Abundância relativa da população eucariota (a) e procariota (b), por análise do filo.

No que respeita aos géneros dominantes, a casta em estudo revelou uma grande abundância dos microrganismos eucariotas *Rhizopus*, *Mucor* e os fungos entomopatogénicos *Zoopthora* e *Pandora*. Considerando agora os filós Ascomycota e Basidiomycota, os géneros dominantes foram *Aureobasidium*, *Sporormiella*, *Alternaria* e *Guignardia*. A população eucariota mostrou-se altamente dinâmica durante o ciclo vegetativo, tendo sido observadas diferenças significativas na população ($p < 0,05$). Entre os microrganismos fitopatogénicos foram encontradas diferenças entre microrganismos como *Guignardia*, *Diaporthe* e *Phomopsis* e entre os microrganismos fitoprotectores foram encontradas diferenças para o *Aureobasidium* e *Rhodotorula* (Figura 2).

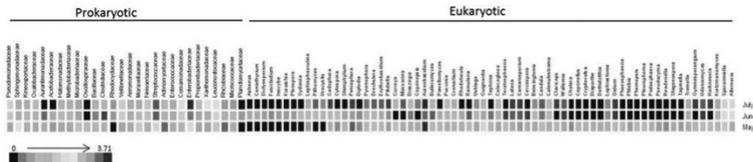


Figura 2: Variação na abundância da população eucariota e procariota ($q < 0,05$) ao longo do ciclo vegetativo. A variação da população durante o ciclo vegetativo pode ser interpretada através da variação da intensidade da cor de cada quadrado. Apenas a população significativa está presente nesta figura ($q < 0,05$).

Importa ainda referir que a aplicação de tratamentos químicos teve um impacto negativo na população microbiana e, após o primeiro tratamento químico aplicado na vinha, foi verificada uma diminuição na biodiversidade eucariota. A incidência destes tratamentos afetou tanto os microrganismos fitopatogénicos como os benéficos.

Nos nossos resultados não foram encontrados os agentes fitopatogénicos principais da videira como o míldio (*Plasmopara viticola*), que poderá ser explicado pela aplicação dos controlos químicos específicos para estes microrganismos. Nos nossos resultados foram ainda encontradas nas folhas, em reduzida abundância, leveduras associadas ao vinho como *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*.

Relativamente à população procariota, as famílias Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Pseudomonadaceae e Moraxellaceae foram as mais abundantes seguidas das famílias Leuconostocaceae, Comamonadaceae, Xanthomonadaceae, Sphingomonadaceae, Veillonellaceae e Neisseriaceae. Foram observadas diferenças significativas nos microrganismos como Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Streptococcaceae, Sphingomonadaceae, Moraxellaceae, Leuconostocaceae durante o ciclo vegetativo (Figura 2). De acordo com a aplicação dos tratamentos químicos, foram encontradas diferenças nas famílias como Bacillaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae ou Halomonadaceae ($p < 0,05$). Nas nossas amostras foram identificadas bactérias lácticas e bactérias ácido acéticas. Algumas das bactérias lácticas e acéticas como *Lactobacillus*, *Weissella* e *Gluconoacetobacter* identificadas nas folhas da videira foram já identificadas em estudos relacionados com mostos de vinho (RENOUF *et al*, 2007; BAE *et al*, 2006; BARATA *et al*, 2012). Este facto é extremamente importante uma vez que indica que um grande número dos microrganismos presentes no vinho provém da vinha.

4-CONCLUSÃO

Os nossos dados revelaram uma alta biodiversidade presente na vinha e uma população muito dinâmica durante o ciclo vegetativo da videira. Foram observados e descritos um elevado número de microrganismos eucariotas e procariotas, tanto benéficos como fitopatogénicos. De uma forma geral, a população eucariota mais abundante é constituída pelo género *Aureobasidium* nomeadamente, *Aureobasidium pullulans* e a população procariota pela família Enterobacteriaceae. É importante notar que estes microrganismos

apresentam um efeito fitoprotector sobre as plantas e são considerados potenciais agentes de controlo biológico. A aplicação de novas ferramentas moleculares baseadas em métodos de culturas independentes como a sequenciação paralela massiva do ADN revelou-se extremamente útil para desvendar o microbioma natural da videira. Este estudo contribui assim para o aprofundar do conhecimento e compreensão das interações estabelecidas entre as comunidades microbianas nomeadamente, entre os microrganismos benéficos e fitopatogénicos, e representa a primeira imagem global da dinâmica microbiana durante o ciclo vegetativo da planta.

5-AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto InovWine financiado pelo FEDER, através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE, e “Quadro de Referência Estratégico Nacional” – QREN, com a referência FCOMP-01-0202-FEDER-011498.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMPANT S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka E (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71: 4951-4959.

BAE S, Fleet GH, Heard GM (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100: 712-727.

BARATAA, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153: 243-259.

FERREIRA R, Monteiro S, Piçarra-Pereira M, Teixeira A (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends Biotechnol* 22: 168-173.

LAIMER M, Lemaire O, Herrbach E, Goldschmidt V, Minafra A, Bianco P et al (2009). Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: a review. *J Plant Pathol* 91: 7-23

RENOUF V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Cell Physiol* 75: 149-164.

SHARPTON T, Riesenfeld S, Kembler S, Ladau J, O'Dwyer J, Green J et al (2011). PhyloTUTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. *Plos Comput Biol* 7: e1001061

SOGIN M., Morrison H., Huber J., Welch D., Huse S., Neal P., Arrieta J., Herndl G., 2006: Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere", *PNAS*, 103 (32): 12115-12120

WHITE J, Bruns T, Lee S, Taylor J., (1990), Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Academic Press, Inc., New York, 315-322

HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS APLICADAS A LA MEJORA DE LOS VINOS TINTO

M.C. BERNAL; E. MUÑOZ-BERNAL; M.E. RODRÍGUEZ; F.J. FERNÁNDEZ-ACERO; J.M. CANTORAL

RESUMEN:

Un factor importante a tener en cuenta para la realización de un vino es la microbiología del proceso. Disponer de un amplio conocimiento microbiológico del proceso de fermentación es fundamental para conseguir que los vinos adquieran especificidad y distinción, ya que la diversidad de levaduras implicadas en dicho proceso es la que proporciona gran parte de la tipicidad y complejidad a los vinos.

En nuestro estudio hemos llevado a cabo una caracterización molecular de las levaduras implicadas en las fermentaciones espontáneas de los vinos tintos biodinámicos en una Bodega de Ribera del Duero (Valladolid).

Tras este análisis de la microbiota y habiéndose detectado la especie *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* en un alto porcentaje, la cual otorga a los caldos propiedades organolépticas de especial relevancia. Esto es debido a la capacidad de realizar la fermentación a baja temperatura, produciendo un perfil de compuestos volátiles responsables de las características diferenciales, por ello se decidió estudiar mediante proteómica diferencial el proteoma de dicha especie para dilucidar las proteínas implicadas en el proceso de vinificación a baja temperatura mediante la comparación de los perfiles obtenidos por electroforesis bidimensional (2DE) y espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF).

KEYWORDS: *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, fermentación, baja temperatura, propiedades organolépticas, tecnologías proteómicas.

1. – INTRODUCCION:

Actualmente, en la industria enológica existe una alta competencia que está llevando a los productores a innovar introduciendo en el mercado, nuevos tipos de vinos. Los consumidores demandan cada vez mas vinos elaborados con estilos más personales y específicos (Bisson et al., 2002; Bisson, 2004).

Las fermentaciones alcohólicas vínicas son procesos complejos en los que están involucradas distintas especies de levaduras. Durante la fermentación espontánea de los mostos se van sucediendo distintas poblaciones de levaduras las cuales aportan deter-

minadas características al vino, describiéndose tres etapas en el proceso. En la primera, cuando el grado alcohólico es bajo predominan géneros de levaduras como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kluyveromyces* etc. En la segunda y tercera fase, a medida que va aumentando el grado alcohólico estas levaduras son sustituidas por cepas pertenecientes, en general, a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

La alta diversidad de levaduras encontrada en las fermentaciones espontáneas puede aportar alta calidad a los vinos con un carácter típico de la región donde se producen, proporcionándoles diferenciación y un valor comercial añadido dentro de un mercado tan competitivo (Fleet, 2008). Sin embargo, el inconveniente de estos procesos naturales es que son impredecibles, pudiéndose producir paradas o fermentaciones lentas, afectando a la calidad de los vinos, aunque la combinación de conocimientos artesanales y tecnológicos pueden asegurar el éxito de esas fermentaciones, las cuales se siguen realizando en numerosas ciudades Europeas (Rainieri, Pretorius, 2000). Una alternativa a las fermentaciones espontáneas son las inoculadas con cultivos iniciadores preparados con levaduras seleccionadas. Estas levaduras están disponibles en el mercado en concentrados secos activos que pueden ser reconstituídos fácilmente para su inoculación en los mostos de uva (Manzano et al., 2006). Sin embargo, se está reconociendo que la utilización de estos cultivos puede llevar a una pérdida en la complejidad de los sabores de los vinos haciéndolos más homogéneos (Rainieri, Pretorius, 2000; Mannazzu et al., 2000). Todos estos aspectos están proporcionando nuevos retos para mejorar las cualidades y valor de los vinos obtenidos mediante fermentaciones inoculadas. Algunos de estos retos son, por un lado, la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas en la zona productora, y por otro lado el seguimiento de la cepa inoculada durante las fermentaciones, lo que permitiría al bodeguero tener un mayor control sobre la fermentación.

2.- APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN ENOLOGÍA

Hasta la década de los noventa, las pruebas microbiológicas clásicas basadas en características morfológicas, bioquímicas y reproducción sexual se utilizaban para identificar y caracterizar levaduras vínicas. Pero estos métodos sólo permitían discriminar entre especies, siendo muy laboriosos e imprecisos. El desarrollo en la década de los noventa

de las Técnicas Moleculares, basadas en el estudio directo del ADN, ha permitido conocer la distribución de distintas especies de *Saccharomyces* a nivel de cepa. La caracterización inequívoca de las cepas de levaduras que participan en un proceso industrial permite identificar las cepas de levaduras más representativas del proceso, establecer la dinámica de poblaciones durante la fermentación espontánea del mosto y detectar el polimorfismo cromosómico típico de las levaduras involucradas en un proceso industrial. Las técnicas moleculares más habituales son la Electroforesis en Campo Pulsante (PFGE) y el análisis del Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (Rodríguez *et al.* 2009, Mesa *et al.* 1999, Mesa *et al.* 2000, Capello *et al.* 2004, Demuyter *et al.* 2004, Schuler *et al.* 2004, Blanco *et al.* 2006, González *et al.* 2007).

2.1. Electroforesis en campo pulsante

Las siglas PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) engloban a una serie de técnicas utilizadas para la separación de moléculas cargadas como el ADN, que tienen en común la aplicación de un campo eléctrico cuya dirección varía en forma de pulsos durante la electroforesis. De esta manera se consigue una dinámica de migración de las moléculas de ADN a través de un gel de agarosa más complejo que permite el aumento del poder de resolución de la técnica con respecto a una electroforesis convencional, consiguiendo separar moléculas de gran tamaño o cromosomas que se diferencian entre sí en relativamente pocas pares de bases.

La utilización de esta técnica requiere una preparación de las muestras para adecuarlas a las condiciones de tratamiento, ya que para separar cromosomas mediante la acción de un campo eléctrico, éstos deben ser liberados del núcleo de las células.

Tras la electroforesis en campo pulsante los cromosomas aparecen dispuestos en forma de patrón de bandas o **cariotipo electroforético**. Los patrones de distintas cepas pueden presentar diferencias en el número, intensidad y movilidad electroforética de las bandas. Estas diferencias son las que ayudan a identificar y caracterizar cepas individuales en un proceso industrial.

Utilizando la electroforesis en campo eléctrico homogéneo, una modalidad de PFGE, ha resuelto el cariotipo de *Saccharomyces cerevisiae* en 15 bandas, correspondiendo cada una a un cromosoma distinto siendo el rango de tamaño de éstos de 200 a 2200 kb.

Las bandas con tamaños por debajo de 500 kb son características de cepas pertenecientes a esta especie. Estudios posteriores revelaron que esta técnica también permite resolver el cariotipo de la especie denominada *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* (Naumov et al. 2002; Tosi et al. 2009).

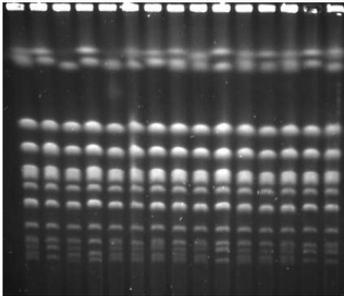


Fig 1: cariotipo electroforético

2.2. Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en sitios o secuencias específicos que se denominan dianas de restricción. Son aisladas de microorganismos simples como bacterias, que las producen fundamentalmente para degradar ácidos nucleicos de origen exógeno como el procedente de la infección de un virus. Estas enzimas, cuyo descubrimiento significó el nacimiento de la Biología Molecular moderna, también juegan un papel muy importante en la identificación y caracterización de cepas de levaduras industriales.

1.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es un método utilizado para amplificar *in vitro* secuencias específicas de ADN mediante ciclos repetidos de síntesis, utilizando cebadores (primers) específicos y la enzima ADN polimerasa, lo cual permite multiplicar hasta mil millones de veces en un tubo de ensayo una secuencia determinada de ADN. El esquema de un ciclo de amplificación de PCR es el siguiente: las dos hebras complementarias de una

cadena de ADN se separan por calor, los cebadores se unen en lugares específicos de cada hebra y a partir de ellos, la *ADN polimerasa* va catalizando la unión de los nucleótidos, tomando como molde cada una de las hebras. El resultado son dos nuevas dobles hebras de ADN.

La enzima *ADN polimerasa* que se utiliza suele ser la *Taq polimerasa* que permanece estable a las altas temperaturas que se utilizan para desnaturalizar el ADN en cada ciclo (hasta 95 °C). Esta enzima fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*.

Los productos de PCR pueden ser analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, o bien ser secuenciados, aumentando el poder de resolución de esta técnica en estudios de caracterización molecular.

En hongos, y particularmente en levaduras, las secuencias de ADN que se han de amplificar deben tener un alto grado de conservación, para evitar considerar los cambios en el genoma debidos a mutaciones puntuales. Una de estas regiones altamente conservadas es la que contiene los genes que codifican para el ARN ribosómico. De manera que la técnica de PCR se utiliza para la identificación taxonómica de levaduras vínicas, amplificando primero estas regiones junto con los espaciadores transcritos internos (ITS). Las secuencias ITS, al ser más variables, se incluyen cuando se pretende distinguir entre cepas relacionadas de una misma especie. Tras la amplificación por PCR se digiere el producto con una enzima de restricción determinada (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999; Fernández-Espinar *et al.* 2000; Espinosa *et al.* 2002).

En algunos casos, estas técnicas también se han utilizado para determinar si los cultivos de cepas de levaduras utilizados como iniciadores de las fermentaciones llegan a ser los dominantes entre la población de levaduras durante el proceso de fermentación (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000; Raspor *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010).

2. – ESTUDIO DE DINÁMICA DE POBLACIONES

En nuestro estudio hemos llevado a cabo una caracterización molecular de las levaduras implicadas en las fermentaciones espontáneas de los vinos tintos biodinámicos en una Bodega de Ribera del Duero (Valladolid). Aplicando la técnica molecular de Electroforesis en Campo Pulsante, analizamos la diversidad de cepas de un total de siete depósitos

en tres estados de la fermentación, inicio, mitad y final durante 6 años consecutivos. Los resultados pusieron de manifiesto la existencia de tres grupos o poblaciones de levaduras. La primera población estuvo formada mayoritariamente por los géneros *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces* y *Hanseniaspora*, siendo dominantes en la primera fase de las siete fermentaciones. La segunda población la formaron cepas de levaduras de la especie *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*; y la tercera estuvo formada por *Saccharomyces cerevisiae*. La diferenciación entre las dos especies de *Saccharomyces* fue realizada en función de la presencia de dos bandas características presentes en el patrón cariotípico a 245 y 370 kb para *S. bayanus* var *uvarum* en lugar de tres bandas típicas para *S. cerevisiae*. Además, mediante el análisis por PCR- RFLP del gen *MET2* corroboramos esta clasificación.

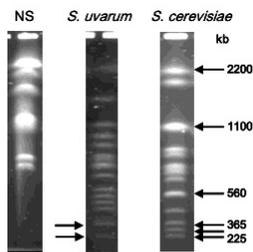


Fig 2: patrones cromosómicos

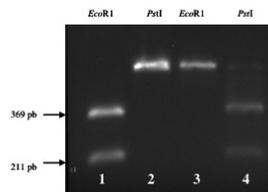


Fig 3: Perfiles de restricción del producto amplificado del gen *MET2* y digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. Las calles 1 y 3 corresponden a muestras de *S. cerevisiae* y 2,4 corresponden a muestras de *S.uvarum*

En general, la población de *S. uvarum* fue mayoritaria a mitad de las fermentaciones siendo desplazada esta especie por cepas de levaduras de *S. cerevisiae* al finalizar los procesos. Este es el primer estudio realizado en España en el que se pone de manifiesto la dinámica de poblaciones de cepas de levaduras *S. bayanus* var *uvarum* en fermentaciones espontáneas de vinos tintos biodinámicos.

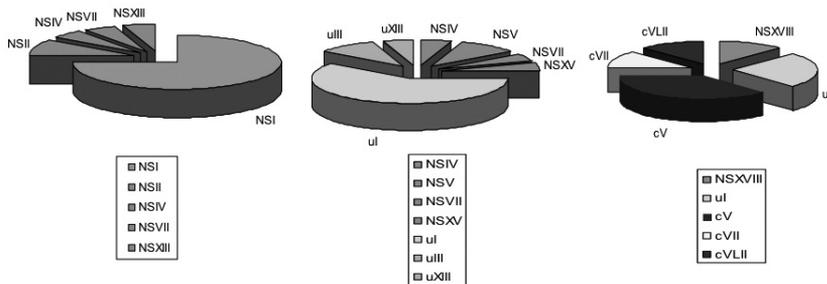


Fig 4: variación de la dinámica de poblaciones en general. Los patrones "NS" representan al género no Saccharomyces, "u" representa a la especie *S. bayanus var. uvarum* y "c" representa a la especie *S. cerevisiae*

3.- MEJORA EN LA CALIDAD DE LOS VINOS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Tras este análisis de la microbiota y habiéndose detectado la especie *Saccharomyces bayanus var. uvarum* en un alto porcentaje, la cual otorga a los caldos propiedades organolépticas de especial relevancia debido a la capacidad de realizar la fermentación a baja temperatura, produciendo un perfil de compuestos volátiles responsables de las características diferenciales, se decidió estudiar mediante proteómica diferencial el proteoma de dicha especie para dilucidar las proteínas implicadas en el proceso de vinificación a baja temperatura mediante la comparación de los perfiles obtenidos por electroforesis bidimensional (2DE) y espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). El proteoma de *S. bayanus var. uvarum* se localizó entre pI 3/10 y Pm 116/14 kDa. Las identificaciones fueron realizadas en el "Cambridge Centre For Proteomics" (University of Cambridge). Para el estudio del análisis cualitativo se utilizó tinción de Coomassie y espectrometría de masa mediante MALDI TOF/TOF, identificándose 71 spots. El estudio cuantitativo se llevó a cabo mediante 2DE-DIGE, siendo 51 el número de spot identificados. Mediante el estudio detallado de estas diferencias podremos dilucidar el papel que cada una de ellas tienen durante la fermentación, lo que podría constituir un nuevo criterio de selección de cepas, así como la búsqueda de biomarcadores de calidad en los vinos.

4.- BIBLIOGRAFIA

- Bisson L.E., Waterhouse L.A., Ebeler S.F., Walker M.A., Lapsley J.T., 2002.
The present and future of the international wine industry. *Nature*, 418: 696-699.
- Bisson L.E., 2004. The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology*, 18: 63-96.
- Blanco P., Ramilo A., Cerdeira M., Orriols I., 2006. Genetic diversity of wine *Saccharomyces* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek*, 89: 351-357.
- Cappello M.S., Blevé G., Grieco F., Dellaglio F., Zacheo G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from must of grape grown in an experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1274-1280.
- Demuyter C., Lollier M., Legras J.L., Le Jeune C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1140-1148.
- Esteve-Zarzoso B., Gostincar A., Bobet R., Uruburu F., Querol A. 2000. Selection and molecular characterization of wine yeast isolated from the “El Penedes” area (Spain). *Food Microbiology*, 17: 553-562.
- Fleet G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8: 979-995.
- González S.S., Barrio E., Querol A., 2007. Molecular identification and characterization of wine yeast isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1018-1025.
- Lopes C.A., Rodríguez M.E., Sangorrín, M., Querol A., Caballero A.C., 2007. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 34: 139-149.
- Mannazzu I., Clementi F., Ciani M., 2002. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeast*. Ciani M., ed. Research Signpost, Trivandrum, India. 19-34.
- Manzano M., Medrala D., Giusto C., Bartolmeoli I., Urso R., Comi G., 2006. Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeast used in wine fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 599-607.
- Mesa J.J., Infante J.J., Rebordinos L., Cantoral J.M., 1999. Characterization of yeasts involved in the aging of sherry wines. *Food Science and Technology*, 32: 114-120.
- Mesa J.J., Infante J.J., Rebordinos L., Sánchez J.A., Cantoral J.M., 2000. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 15-21.

- Raspor P., Cus F., Povhe Jemec K., Zagorc T., Cadež N., Nemanic J., 2002. Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 95-102.
- Rainieri S., Pretorius I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50: 15-31.
- Rodríguez M.E., Infante J.J., Molina M., Domínguez M., Reboordinos L., Cantoral J.M., 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1292-1302.
- Schuller D., Valero E., Dequin S., Casal M., 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 19-26.
- Muñoz-Bernal E., Rodríguez M.E., Benítez P., Fernández-Acero F.J., Rebordino L., Cantoral J.M. 2013. Molecular analysis of red wine yeast diversity in the Ribera del Duero D.O. (Spain) area. *Archives Microbiology*
- Fernández-Acero, F.J.; Carbú, M., El-Akhal, M.R., Garrido, C., González-Rodríguez, V.E. and Cantoral, J.M., 2011. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 795-816.

BOTRYTIS CINEREA PROTEOME STUDIES

F. J. FÉRNANDEZ-ACERO; E. LIÑEIRO; J. M. CANTORAL

SUMMARY:

Botrytis cinerea is one of the most important fungal plant pathogens in grapevines. In recent years, different laboratories have accumulated a great amount of relevant molecular information related to pathogenic mechanisms used by this organism. The appearance of proteomics technologies is allowing the functional annotation of the genome. Recent studies have revealed that is the proteome the relevant level of analysis to understand complex biological processes. Using proteomic techniques, our group has been studying the biology of this pathogen. The purpose of these studies has been focused to reveal new virulence factors that help to understand the infection process and its potential use as therapeutic targets for new environmental-friendly fungicide design

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*, plant pathogen, grapevine, grey mold, proteomics technologies, virulence factor, therapeutic target, fungicide design.

1. – INTRODUCTION:

The ascomycete *Botrytis cinerea* is one of the most devastating phytopathogenic fungi, affecting more than 235 different plant species, at any plant stage or tissue, including the grape vine plants among its hosts, causing the disease known as “Grey mold”. The interference produces by fungal invasion and tissue maceration in grapes produces several alterations in must quality and wine making process, i.e. by increasing the level of gluconic acid. In spite of some wineries used *Botrytis* to produces special wines, the plant infection by this fungus is one of the main cost to the wine-grower. Moreover, *B. cinerea* has been adopted as a model biological system in molecular phytopathology; due to, among other reasons, the amazing variety of infection strategies used by the fungus and its necrotrophic characteristics, being the subject of numerous studies related to their biochemistry, pathogenicity and disease control in recent years.

1.1.- Exploring Pathogenicity/Virulence factors in *B. cinerea*.

This pathogen employs diverse strategies to infect and colonize the plants, establishing a complex interaction between fungus and hosts (Fernández-Acero *et al.* 2011). *B. cinerea* synthesises and secretes a wide variety of different enzymes, including toxins

and proteins. They are used to kill plant cells and then consume the tissue transforming plant biomass into fungal biomass. *B. cinerea* posses a considerable number of genes, which encode these proteins, metabolites and toxins, and they are involved in its infection cycle. These genes have been named pathogenicity and/or virulence factors. To avoid misunderstandings of these terms, a pathogenicity factor is defined as a gene, protein or toxin that is necessary for the development of the disease, but is not essential for completing the pathogen life cycle in vitro. Pathogenicity refers to the capacity of a pathogen to cause disease. Virulence factors are those that are able to regulate the intensity of the infection, and virulence can be considered as the degree of pathogenicity of the corresponding gene, protein or toxin (Fernández-Acero *et al.* 2007a).

In the case of *B. cinerea* there are an increasing number of known virulence and pathogenicity factors produced during the infection process but their roles vary among strains: a gene essential for virulence in one strain may be expendable in another. Many of the results are listed in the Pathogen-Host Interactions database (PHI-base, www.phi-base.org). This database contains more than one thousand entries, and therefore is a catalogue of experimentally verified pathogenicity, virulence and effector genes from fungal, Oomycete and bacterial pathogens, which infect animal, plant, fungal and insect hosts.

Traditional molecular genetic analysis in *B. cinerea* have consisted in the study of these “interesting” genes using several molecular strategies, i.e. transcriptomics studies, production of knock-out mutants, pathogenicity tests, etc. The results obtained from these molecular strategies have increased since 2007, when the complete genome of this species was sequenced and published in the Broad Institute Database for public perusal (www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genomeinitiative), making easier the molecular approach to the biology of this fungus for the research groups.

Although the knowledge of the pathogenicity/virulence factors essential for fungal infections is very important, due to it represents the main targets that researchers must attack in the fight against this pathogen microorganism. Recently modern development

of proteomic techniques has accumulated a highly valuable quantity of information and several approaches leading to a broader view of these fungal infection strategies. Proteomic approaches, in which complex samples containing hundreds of proteins are identified in an experimental setup, offer a whole new perspective. Proteomics is a powerful potential tool for dissecting the molecular mechanisms underlying fungus-plant interactions (Bhadauria *et al.* 2007). Valuable knowledge is being obtained from these studies in the functional analysis of gene products and cellular pathways, and proteomics is being used to discover the proteins involved in particular disease stages (Fernández-Acero *et al.* 2011). Therefore, our work uses highly-focused proteomics, in a proteome mining approach, to find pathogenicity/virulence factors, or new proteins candidates with a suggested role as therapeutic target for new environmental friendly fungicide design without any previous selection of gene candidates, completing the results obtained in *B. cinerea* from traditional molecular genetics approaches because by using only genetic studies, we cannot yield a complete picture of relevant events. The deep study of the post-genomic proteomics techniques defines what has a role when and where in disease development. A fragmentary view on virulence factors provides only a few potential targets for anti-fungal action. Therefore, our work uses highly-focused proteomics, in a proteome mining approach, to find pathogenicity/virulence factors, or new proteins candidates with a suggested role as therapeutic target for new environmental friendly fungicide design without any previous selection of gene candidates.

2. – APPLYING PROTEOMICS TO UNRAVEL *B. cinerea* INFECTIVE STRATEGIES

2.1.- Historical Background of our *B. cinerea* proteomic approaches.

Since 2004, our Group has been leading the development of proteomic studies on plant pathogenic fungi, mainly *Botrytis cinerea*. Proteomics has been defined as the study of the whole proteins produced by a specific organism under specific conditions. It is a highly dynamic system where experimental conditions are crucial to understand the experimental results. Our initials steps got almost 20 protein identifications to construct the first proteome map of *B. cinerea*. In spite of this goal, we check that only a few papers have reported a proteomic approach to the fungus itself. We planned to make

available to the scientific community a proteomic database containing a significant number of identified proteins from *B. cinerea* during cellulose degradation, as main plant cell wall compound. We used, three biological samples, and the extracted proteins were independently separated by 2-D PAGE to obtain the proteome map from *B. cinerea*. More than 300 proteins spots were selected for MALDI TOF/TOF MS analysis, resulting in 267 positive identifications, most representing un-annotated proteins. Identified proteins were then classified into categories using the PANTHER classification system, showing the relevance of protein metabolism and modification process and oxidoreductase activity (Fernandez-Acero *et al.* 2009).

The next step was to complete the map by describing the secreted proteins. Our research used 2-DE, MALDI TOF/TOF-based approach to establish the proteins secreted to culture media supplemented with different carbon sources and plant-based elicitors (in this study: glucose, cellulose (CMC), starch, pectin, and tomato cell walls (TCW)). An improved method to precipitate the proteins based on DOC-TCA/phenol extraction was optimized. The secretome profiles induced by the five different carbon sources were visualized showing clear differences in the *B. cinerea* response to glucose, starch, pectin, CMC and TCW, indicating that each assayed carbon source elicits a specific secretion response. Obtained data showed that the secretion of proteins is similar in glucose, starch and pectin, but that many more spots are detectable after CMC treatment and still more when TCW is the sole carbon source. Seventy six spots were identified, yielding 95 positive hits that correspond to 56 unique proteins, including several known virulence factors (i.e. pectin methyl esterases, xylanases and proteases). The observed increases in secretion of proteins with established virulence-related functions indicate that this in vitro-induction/proteome mining approach is a promising strategy for discovering new pathogenicity factors and dissecting infection mechanisms in a discrete fashion (Fernandez-Acero *et al.* 2010).

2.2.- Following signalling cascades mechanisms in *B. cinerea*: Membrane and Phosphorylated Proteomes.

As has been mentioned previously, *B. cinerea* is able to infect a large number of plant

species worldwide. The wide variety of observed symptoms in different plant and tissues, and the high variability observed in molecular approaches to *B. cinerea* have proved that the fungus can develop multiple different strategies to complete the infection cycle. The mechanism developed by the phytopathogenic fungi *B. cinerea* to infect different plant tissues is a very complex process. The pathogen must choose the right initial time point to start, or not, every stage of its infective cycle. In addition each of these stages is accompanied by the development and synthesis of infective structures (germ tube, appressorium, etc.) and enzymes and toxins, which are necessary for a normal development of the infective cycle too (Van Kan *et al.*, 2006). In this process the surrounding environment is crucial for fungal development. In this sense the cellular signaling cascades constitutes the communication bridge between environmental conditions and the cellular machinery of the organism, and therefore they are responsible for regulating the development of the fungus, as well as its infective stages. All this process is based in transport and signal transduction from the outside to the cytosol and the nucleus, being involved in this event an increasing number of proteins from the beginning of the stimulus through the adhesion of one or more ligands to membrane receptors, until activation of a effectors set that will convert that stimulus in a particular physiological response.

Membrane proteins play a key role throughout this process as a primary triggers in signaling cascades, since from these receptors the stimulus is transmitted into the cell through various posttranslational modifications of proteins involved in the signaling cascade. Between these modifications, protein phosphorylation/dephosphorylation is one of the most relevant and widely studied. To date, there is not a description of these proteins function in the pathogenic fungi infection cycle, only partial functions are known by gene to gene approaches. However, in *B. cinerea* BMP1 gene which coding for a MAP kinase has emerged as one of three pathogenicity factors known to date in this pathogen (Zheng *et al.*, 2000). Besides this, it has been shown the role of this signaling pathway regulated by MAP kinases in the regulation of the growth, differentiation, survival, and pathogenesis in different fungal pathogens (Xu, 2000). As a result of the great relevance of these signaling cascades in the infective cycle of fungal pathogens is critical to decipher the set of proteins involved in these networks. These studies have traditionally been

developed identifying the components of each signalling cascade one by one. However, proteomics, together with subsequent analysis by mass spectrometry is a rapid and sensitive method to study changes in the protein content of an organism from a global perspective, providing significant biological information to help clarify and understand the complexity of all these processes so its application to the study of protein-protein interactions and signalling cascades is gaining strength and is establishing as a basic and fundamental tool thanks to its flexibility to determine the components of these signalling cascades in its entirety without having to choose a number of candidate genes from the beginning (Preisinger *et al.*, 2008).

Now we are focusing our interest in a new innovative project, to tackle the study of signalling cascades by proteomics. Differential proteomics analysis has been developed to study membrane protein content of fungal under two pathogenic conditions, (i) constitutive (growing with MSM and Glucose) and (ii) induced pathogenicity (with deproteinized TCW). Protein extracts were obtained by using Triton X-114. Different 2-DE profiles were obtained. Three protein groups were determined: (i) 13 spots present in both conditions, (ii) 16 spots exclusive in constitutive state and (iii) 41 spots exclusive in pathogenic conditions. These results prove the differential expression of membrane proteins of *B. cinerea* by induction. The significant spots are currently under identification by MALDI TOF/TOF. In addition, we are carrying out a new LC-MS/MS based approach in order to increase the sensitivity in the identification process.

On the other hand we are focusing, on the set-up of an efficient method for the characterization of phosphorylated proteins that are expressed by the fungi in a concrete moment. We are currently working on improving a phosphopeptide enrichment method based on the use of a first ERLIC step (to isolate phosphopeptides selectively from tryptic digests and separate it in different fractions with high resolution) coupled to a second enrichment step, of these isolated fractions, with TiO₂ and analyzed by nanoflow HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. Once the method was developed, based on previous experience of the group in this type of analysis, we will hold the differential proteomic study in which we compare the profiles expressed by *B. cinerea* in

two phenotypically different stages: constitutive state and virulence induction state. This will provide a valuable information about phospho-signaling pathway and will help us to know which of these phosphoproteins are involved in the mechanisms of virulence / pathogenicity of the fungus. This study of *B.cinerea* phosphoproteome under different induction conditions would be the first proteomic approach to this important signalling network in this phytopathogenic fungus.

The identification and characterization of these two subproteomes: membrane proteins and phosphoproteins, will give us more information about the nature and function of these proteins, helping us to understand the mechanism that the fungus uses for developing the infectious process and the role of these proteins as a possible pathogenic/virulence factor providing us potential target sites for new and specific fungicides design to control that plant pathogen giving farmers more tools for action against infection caused by these pathogens.

3. – RUNNING PROJECTS AND FUTURE PERSPECTIVES.

In spite of the development of proteomics technologies over the biology of phytopathogenic fungi, there are a lot of unknown areas to study. Our group is now involved in several projects to unravel these empty areas through proteomics. We are mainly tackling approaches to obtain subproteomes, such as PTMs and/or different cellular structures/organelles. The main idea is to focus our experimental design to the fungal infection cycle using pathogenicity triggers. Moreover, we are beginning the application of this technology to a wide set of fungi i.e. *Colletotrichum* spp. main pathogen of the strawberry crops. Our main purpose is to use the collected information to produce new and environmental friendly fungicides. We are collaborating with several research groups to the development of these new compounds.

REFERENCES.

- Bhadauria, V., Zhao, W.-S., Wang, L.-X., Zhang, Y., Liu, J.-H., Yang, J., Kong, L.-A. and Peng, Y.-L., 2007. Advances in fungal proteomics. *Microbiological Research*, 162: 193–200.
- Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., *et al.*, 2006. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics*, 6:S88-S96.
- Fernández-Acero, F.J., Carbú, M., Garrido, C., Vallejo, I. and Cantoral, J.M., 2007a. Proteomic advances in phytopathogenic fungi. *Current Proteomics*: 79–88.
- Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., *et al.*, 2007b. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. *Arch of Microbiol*, 187:207–215.
- Fernández-Acero, F.J.; Carbú, M., El-Akhal, M.R., Garrido, C., González-Rodríguez, V.E. and Cantoral, J.M., 2011. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 795-816.
- Garrido, C., Cantoral, J.M., Carbú, M., González-Rodríguez, V.E. and Fernández-Acero, F.J., 2011. New proteomic approaches to plant pathogenic fungi. *Current Proteomics*, : 306–315.
- Preisinger, C., Kriegsheim, A. V., Matallanas, D. and Kolch, W., 2008. Proteomics and phosphoproteomics for the mapping of cellular signalling networks. *PROTEOMICS*, 8: 4402-4415.
- Van Kan, J.A.L., 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *TRENDS in Plant Science*, 11: 247-253.
- Xu, J.-R., 2000. MAP Kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 137-152.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam S. and Xu J.-R., 2000. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 724-732.

CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS LEVADURAS PARA LA ELABORACIÓN DE CAVA

Manuel RAMÍREZ ^{1*}, Rocío VELÁZQUEZ ¹, Alexis GILLET ³, Estelle PEYRASSE ³, Emiliano ZAMORA ², Pedro COTILLA ², María Luz ÁLVAREZ ²

RESUMEN

La elaboración de cava está en continuo crecimiento en Extremadura y es una alternativa para incrementar el valor añadido del vino. Hemos analizado nuevas levaduras autóctonas para elaborar cava. Aunque todas las levaduras analizadas parecen tecnológicamente adecuadas para elaborar cava, hemos seleccionado varias de estas levaduras en base a su cinética de fermentación y la calidad del vino producido. La calidad del cava depende del envejeciendo del vino con las levaduras, que una vez muertas se autolisan y liberan al vino compuestos intracelulares y de la pared celular. Para incrementar los productos de autolisado hemos analizado la posibilidad de inocular el vino base con mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles para realizar la segunda fermentación. En algunas mezclas de levaduras killer y sensibles se incrementa la muerte celular.

Palabras clave: levaduras, killer, cava, manoproteínas, *Saccharomyces*, *Torulaspota*.

1 - INTRODUCCIÓN

La elaboración de cava es una actividad en continuo crecimiento en Extremadura, se ha cuadruplicado desde 2004, y supone una alternativa para incrementar el valor añadido del vino, que se comercializa mayoritariamente como granel. Todo parece indicar que, para seguir este proceso ascendente en volumen de ventas, nuestro cava debe seguir mejorando su calidad. La composición química y la calidad de los vinos espumosos depende de muchos factores como la variedad de uva (Anderson, et al., 2008), la gestión del viñedo (Pozo-Bayon, et al., 2003), la calidad del vino base (Girbau-Sola, et al., 2002),

¹ *Departamento de Ciencias Biomédicas Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz (Spain). mramirez@unex.es.*

² *Estación Enológica, Consejería de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Energía. Junta de Extremadura. Almendralejo (Spain), Badajoz.*

³ *IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne BP 17867 21078 DIJON CEDEX (France).*

o la estirpe de levadura inoculada en la segunda fermentación (Torrens, et al., 2008). Sin embargo, la segunda fermentación y la crianza del vino con las lías de levaduras son factores claves en la calidad de los vinos espumosos. Durante este envejecimiento se produce la autólisis de las levaduras que realizaron la segunda fermentación, se hidrolizan los biopolímeros celulares y se liberan los compuestos intracelulares (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y de la pared celular (glucanos, manoproteínas) en el vino. Esto determina en gran medida las propiedades químicas y sensoriales del vino espumoso (revisado por Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006).

La mayoría de los trabajos realizados sobre la autólisis en enología han seguido dos enfoques principales. Por un lado, el estudio de la degradación de la pared celular de las levaduras durante la autólisis (Charpentier, et al., 1993; Martínez-Rodríguez, et al., 2001) y por otro, el de los diferentes productos liberados al vino. Entre todos los compuestos liberados durante la autólisis de las levaduras, péptidos y aminoácidos se consideran los más importantes (Guilloux-Benatier and Chassagne, 2003; Moreno-Arribas, et al., 2009). Se ha demostrado que en los primeros estadios de la autólisis se liberan los péptidos, y que posteriormente éstos son hidrolizados hasta aminoácidos (Moreno-Arribas and Polo, 1996). Los péptidos de bajo tamaño son funcionalmente importantes, tienen propiedades tensioactivas y bioactivas (antioxidantes, antimicrobianos, antihipertensivos) y participan en las propiedades sensoriales del vino (Desportes, et al., 2001). Adicionalmente, las manoproteínas parecen ser responsables directas de la sensación en boca y de la calidad y estabilidad de la espuma del cava.

La autólisis natural de las levaduras es un proceso muy lento que puede durar varios años. Normalmente ocurre en células al final de la fase estacionaria de crecimiento y está asociada a la muerte celular (Babayan and Bezrukov, 1985). Desde hace años se investiga la forma de acelerar este proceso, contemplándose básicamente dos métodos de aplicación en vinos espumosos: añadir autolisados de levaduras al vino, o incrementar la temperatura durante el envejecimiento en botella para acelerar la autólisis (Charpentier, et al., 1993). Sin embargo, ambas técnicas producen defectos organolépticos en el vino espumoso como un desagradable sabor a tostado. El uso de levaduras con una buena capacidad autolítica puede mejorar la calidad de los vinos espumosos, y se recomienda utilizar esta capacidad como criterio fundamental en la selección de levaduras para la

segunda fermentación (Martinez-Rodriguez, et al., 2001). De hecho, utilizando levaduras mutantes con una capacidad de autólisis acelerada se ha conseguido mejorar las propiedades de la espuma del cava, además de reducir el tiempo de envejecimiento y los costes de elaboración del producto (Nunez, et al., 2005). Se han utilizado distintos tipos de mutantes de levaduras para incrementar su capacidad autolítica: mutantes autolíticos termosensibles con la pared celular alterada que liberan los polisacáridos de la pared durante la fermentación (Giovani and Rosi, 2007), o mutantes alterados en el proceso de autofagia para autolisar las levaduras y acelerar el envejecimiento del cava (Tabera, et al., 2006). No obstante, hasta lo que conocemos, estos mutantes no se utilizan a escala comercial, probablemente porque no cumplan con las exigencias de vigor o eficacia biológica que se exige a las levaduras industriales en el proceso de producción y utilización en bodegas, con las que sí cumplen muchas levaduras silvestres y no cumplen la mayoría de los mutantes, especialmente si están afectados en algún proceso metabólico básico para la célula.

Otra alternativa consiste en utilizar mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles como inóculos en la segunda fermentación. La toxina asesina mata a las células sensibles y acelera su autólisis (Todd, et al., 2000). Aunque esta estrategia ha dado prometedores resultados en sistemas modelo en laboratorio, aún no se ha aplicado en la industria ni se ha analizado su efecto sobre las propiedades organolépticas de vinos espumosos. Estos estudios iniciales se realizaron cuando sólo se conocía un tipo de levaduras vínicas killer, K2. Hoy disponemos, además de nuevas cepas de levaduras K2 con buenas características enológicas (Ambrona, et al., 2005; Ambrona, et al., 2006; Pérez, et al., 2000; Ramírez, et al., 1998; Ramírez, et al., 1999; Regodón, et al., 1997; Rodríguez-Cousiño, et al., 2011), y dos nuevos tipos de levaduras vínicas killer con fenotipos más interesantes.

En este trabajo se estudia el comportamiento de nuevas levaduras autóctonas en la elaboración del cava, se comparan con dos levaduras comerciales adecuadas para la segunda fermentación de vinos espumosos, y se analiza la posibilidad de inocular la segunda fermentación del cava con cultivos mixtos de estas levaduras y las nuevas levaduras killer. Se pretende incrementar la muerte celular y acelerar la autólisis de las levaduras para mejorar la calidad del vino.

2 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 - Cepas de levaduras, tiraje de cava y análisis de la segunda fermentación

En los experimentos iniciales de tiraje en bodega comercial se utilizaron 16 levaduras vínicas autóctonas seleccionadas y dos comerciales (IOC18-2007 del Instituto Oenologique du Champagne, y levadura encapsulada Cremanti de la compañía La Littorale). Una vez seleccionadas las levaduras Rod231B y EX85, en los tirajes inoculados con mezclas de levaduras killer en tubos de laboratorio se utilizaron las levaduras *Saccharomyces* EX85R (K2⁻, CYH^R), Rod23 (K2⁺, ROD^{PC}, CYH^R), EX229 (Klus, CYH^S), EX85 (K2⁺, CYH^S); y las *Torulaspota* EX1180 (Kbarr, CYH^S), CH126 (Kbarr, CYH^S), EX118011C4 (Kbarr, CYH^R), EX1180-2K- (K⁻, CYH^R), EX229R1 (Klus⁻, CYH^R).

Las levaduras se crecieron en 500 mL de YEPD y se concentraron a 50 mL (10×). Previamente al tiraje, las levaduras se adaptaron al crecimiento en vino base. Al vino base (*Macabeo*) se le añadió 25 g/L azúcar, 0,2 g/L (NH₄)₂HPO₄ y 5 g/L bentonita (solo en bodega). El análisis de la presión se realizó por termostatación del cava a 20°C y medida directa con afrómetro adaptable al tapón de corona. Se analizó: grado alcohólico (% v/v), presión (atm), azúcares residuales (g/L), acidez volátil (g/L), acidez total (g/L), pH, ácido láctico (g/L), y extracto seco (g/L). En los tirajes inoculados con mezclas de levaduras killer en tubos de laboratorio se monitorizaron las poblaciones de levaduras analizando la resistencia a cicloheximida (CYH^R) o rodamina 6G (ROD^{PC}) mediante réplica en placas de YEPD suplementado con 2ug/mL de cicloheximida o 5ug/mL de rodamina 6G respectivamente.

3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fermentaciones se pudieron agrupar según la evolución del grado alcohólico, consumo de azúcares y presión en la botella (Fig. 1). Según el grado alcohólico se establecieron cuatro grupos de fermentaciones: 1) Con concentraciones finales de alcohol superiores al 12% (v/v) (levadura Cremanti y EX88R), 2) entre 11,75% y 12% (IOC 18-2007, EX33, EX73, y EX98), 3) entre 11,75 y 11,5% (EX1, EX34, EX47, EX85, EX88, y SMR165AR), y 4) entre 11,5% y 11% (7AR, E3AR1, E7AR1, SMR1011D, Rod231B, y Rod256D) (Fig. 1A).

Según la máxima presión alcanzada en la botella se clasificaron en tres grupos: 1) Con presiones superiores a 8 atms (Cremanti, IOC1008-2007, EX1, EX33, EX34, EX73,

EX88, EX98, EX88R, E3AR1, y SMR165AR), 2) entre 7 y 8 atms (EX47, EX85, 7AR, SMR1011D), y menor de 7 atms pero siempre mayor de 6 atms (E7AR1, Rod231B, y Rod256D) (Fig. 1B).

Según la cantidad de azúcares residuales en el cava se establecieron tres grupos: 1) Con concentraciones menores de 3 g/L (Cremanti, EX1, EX33, EX98, EX88R), 2) entre 3 y 6 g/L (IOC1008-2007, EX34, EX47, EX73, EX88, SMR165AR), y 3) entre 6 y 12 g/L (EX85, 7AR, E7AR1, E3AR1, SMR1011D, Rod231B, Rod256D) (Fig. 1C).

Las levaduras comerciales estuvieron siempre en el primer o segundo grupo, con las mejores levaduras desde el punto de vista tecnológico. Prácticamente todas las levaduras autóctonas analizadas podrían ser utilizadas para la elaboración de cava al producir más de 6 atms de presión y dejar menos de 12 g/L de azúcar. Algunas de ellas acompañaron siempre a las levaduras comerciales entre las mejores (EX33, EX88R y EX98). Sin embargo, las mejores levaduras en base a la calidad organoléptica de los cavas fueron las autóctonas Rod231B, E7AR1 y E3AR1 (Tabla 1) que, lamentablemente, estuvieron entre las más discretas en cuanto a sus cualidades tecnológicas.

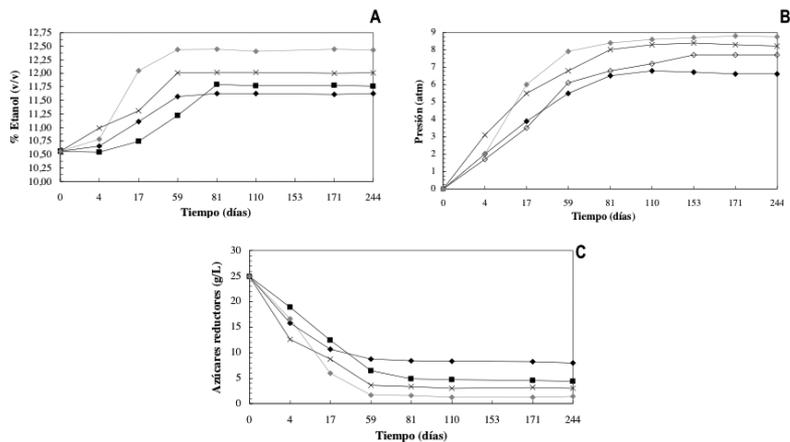


Figura 1. Ejemplos de evolución de la concentración de etanol (A), presión en la botella (B), y consumo de azúcares reductores (C) a lo largo de la segunda fermentación y crianza en los cavas elaborados con las diferentes levaduras. ◊: Levadura encapsulada Cremanti. ◩: Levadura comercial IOC 18-2007. ■: EX88. ◊: E7AR1. ○: 7AR. □: EX88R. ▲: Rod231B.

TABLA 1. Parámetros analíticos análisis organoléptico de los cavas elaborados con distintas levaduras autóctonas y comerciales.

Levadura	Grado Alcohólico	Presión (atm)	Az, reductores (g/L)	A.V (g/L)	A.T (g/L)	pH	Málico (g/L)	Láctico (g/L)	Extracto seco (g/L)	Aceptación
EX88	11,76	7,9	4,4	0,35	4,2	3,36	0,09	0,87	23,2	60
ROD231B	11,6	6,3	8,3	0,38	4,1	3,38	0,09	1,94	27,9	85
ROD256D	11,63	6,9	8,1	0,38	4,1	3,39	0,09	0,89	26	70
SMR1011D	11,66	7,8	7,4	0,39	4,1	3,42	0,09	0,9	26,1	50
SMR165AR	11,58	8,1	3,7	0,35	4,2	3,42	0,09	0,96	21,5	74
E7AR1	11,63	6,6	8	0,38	4,5	3,34	0,09	0,92	23,2	82
E3AR1	11,54	8,4	8	0,37	4,6	3,41	0,09	0,9	25,7	80
7AR	11,62	7,7	6,3	0,36	4,4	3,34	0,09	0,88	23	55
EX1	11,86	8,2	2,6	0,37	3,7	3,49	0,09	1,65	22,3	40
EX33	11,99	8,3	2,8	0,34	4,1	3,56	0,09	0,92	24,9	42
EX34	11,83	8	3,8	0,36	4,2	3,36	0,09	0,93	21,3	72
EX47	11,79	7,9	4,3	0,4	4,3	3,37	0,09	0,99	21,2	75
EX73	11,97	7,3	4,6	0,4	4,2	3,4	0,09	0,97	22,8	66
EX85	11,78	7,1	7	0,4	4,7	3,29	0,09	0,93	22,3	76
EX98	12,03	8,6	2,2	0,36	3,9	3,42	0,09	1,2	20,4	71
EX88R	12,2	8,6	2,6	0,35	4,9	3,25	0,21	1,1	16	69
IOC1008-2007	12,01	8,2	3	0,36	4,4	3,37	0,09	1,24	19,9	72
Cremani	12,43	8,75	1,4	0,35	5,1	3,21	0,09	1,08	14,4	72

Los cavas con más presión tuvieron más grado alcohólico, menos azúcares residuales, más acidez volátil, más ácido láctico y mayor pH. Es decir, a más azúcares consumidos más etanol y CO₂ se genera, incrementando la presión. Los cavas con más alcohol tuvieron menos extracto seco, ya que tenían menos azúcares residuales. Además, los cavas con más azúcares reductores presentaron más acidez volátil y más ácido láctico, probablemente porque los azúcares residuales potencien la actividad de bacterias lácticas. Los cavas con mayor acidez total fueron los preferidos por el comité de cata.

En base a estos resultados, se seleccionaron las levaduras Rod231B y EX85 para realizar nuevos tirajes inoculando estas levaduras mezcladas a partes iguales con las nuevas levaduras killer *Klus* y *Kbarr* en tubos de laboratorio que no conservan la presión de CO₂. Todas las fermentaciones inoculadas con alguna estirpe de *Saccharomyces* (sola o en mezcla) terminaron la segunda fermentación prácticamente el día 10, mientras que las fermentaciones inoculadas sólo con *Torulaspóra* fueron mucho más lentas, terminando la mayoría después de 45 días (Figura 2 A y B). Se apreció desplazamiento (subida o bajada del marcador genético CYH^R o ROD^{PC}) de alguna de las dos levaduras de la mezcla inoculada en varias de las fermentaciones (Figura 2 B y D), lo que debería acelerar la autólisis de las levaduras.

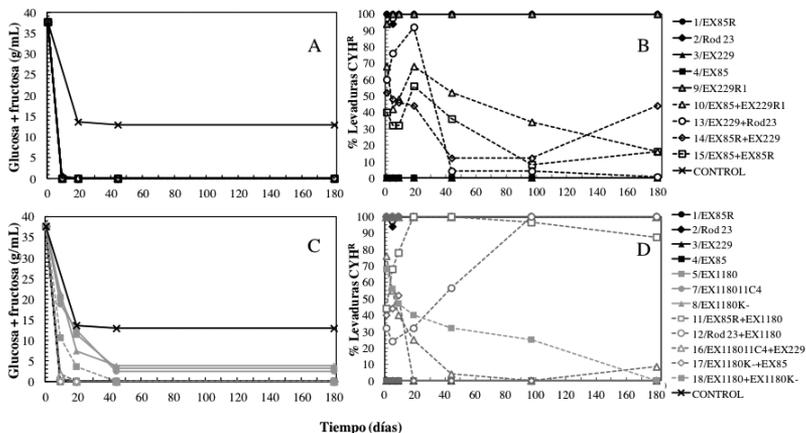


Figura 2. Evolución de la cantidad de azúcar (A y C) y las levaduras CYHR^R (B y D) durante la segunda fermentación de cava en tubos de laboratorio. A y B, fermentaciones inoculadas sólo con levaduras *Saccharomyces* (una levadura o mezcla de dos). C y D, inoculadas sólo con levaduras *Torulaspora* (una levadura o mezcla de dos) o con mezclas de *Saccharomyces* y *Torulaspora*.

4 - CONCLUSIONES

Todas las levaduras autóctonas seleccionadas alcanzaron niveles de presión superiores a 6 atms, y consumieron los azúcares hasta niveles inferiores a 2,2 a 8,3 g/L. En consecuencia, se podrían utilizar para la elaboración de cavas brut, extra brut y brut nature. Sólo algunas de las mezclas de levaduras killer parecen incrementar la proporción de levaduras muertas durante el tiraje. *Saccharomyces* parece evitar el efecto killer de *Torulaspora* debido a su mayor velocidad de crecimiento y vigor fermentativo.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos GR10088 (Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico, Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España). Matilde Maqueda ha sido becaria del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y Rocío Velázquez becaria de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación (Junta de Extremadura).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, H. and Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**, 119-127.
- 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.
- Anderson, M. M., Smith, R. J., Williams, M. A. and Wolpert, J. A. (2008). Viticultural evaluation of French and California Pinot noir clones grown for production of sparkling wine. *Am.J.Enol.Vitic.* **59**, 188-193.
- Babayan, T. L. and Bezrukov, M. G. (1985). Autolysis in yeast. *Acta Biotechnology*, 129-136.
- Bakalinsky, A. T. and Snow, R. (1990). Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallism. *Appl.Enviro.Microbiol.* **56**, 849-857.
- Charpentier, C., Feuillat, M. and Fleet, G. (1993). Yeast autolysis, *Wine microbiology and biotechnology*, Harwood Academic Publishers, pp. 225-242.
- Desportes, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Maujean, A. and Duchiron, F. (2001). Isolation, identification, and organoleptic characterization of low-molecular-weight peptides from white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 376-380.
- Giovani, G. and Rosi, I. (2007). Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *Int.J.Food Microbiol.* **116**, 19-24.
- Girbau-Sola, T., Lopez-Tamames, E., Bujan, J. and Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration 1 base wine characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5596-5599.
- Guilloux-Benatier, M. and Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 746-751.
- Martinez-Rodriguez, A. J., Polo, M. C. and Carrascosa, A. V. (2001). Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int.J.Food Microbiol.* **71**, 45-51.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. and ozo-Bayon, M. A. (2009). Peptides, *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Life Sciences Science Business Media Eds., LLC.: New York, pp. 191-209.
- Moreno-Arribas, V. and Polo, M. C. (1996). Peptides in musts and wines. Changes during the man-

- ufacture of cavas (Sparkling wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3783-3788.
- Nunez, Y. P., Carrascosa, A. V., Gonzalez, R., Polo, M. C. and Martinez-Rodriguez, A. J. (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 7232-7237.
- 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.
- Pozo-Bayon, M. A., Hernandez, M. T., Martin-Alvarez, P. J. and Polo, M. C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2089-2095.
- Ramírez, M., Pérez, F. and Regodón, J. A. (1998). A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5039-5041.
- Ramírez, M., Regodon, J. A., Pérez, F. and Rebollo, J. E. (1999). Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles. *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 212-218.
- 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.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E. and Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (*Klus*) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1822-1832.
- Tabera, L., Muñoz, R. and Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2351-2358.
- Todd, B. E. N., Fleet, G. H. and Henschke, P. A. (2000). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 65-72.
- Torrens, J., Urpi, P., Riu-Aurnatell, M., Vichi, S., Lopez-Tamames, E. and Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* **124**, 48-57.

AVANCES EN CONTROL BIOLÓGICO DURANTE LA ELABORACIÓN DE VINO.

José María HERAS¹; Fernando PEDROSA²; Nuno ALVES²

RESUMEN

Existe una amplia gama de diferentes microorganismos que coexisten en el medio de la uva y el mosto. *Saccharomyces* es con frecuencia la levadura dominante durante la fermentación dada su resistencia a las difíciles condiciones que se dan en el vino, pero hay otras levaduras que también están presentes. Algunas de estas “otras” especies, como *Torulaspota delbrueckii* ó *Metschnikowia pulcherrima* han sido estudiadas y seleccionadas por su capacidad para intensificar y mejorar la calidad de los vinos. Por otra parte, podemos encontrar a menudo microorganismos que pueden mermar la calidad del vino, como *Brettanomyces*, etc. El control biológico durante las fermentaciones, se presenta como una herramienta fundamental para explotar el potencial organoléptico de las uvas y evitar el desarrollo de compuestos indeseables que mermen la calidad del vino. En este sentido, nuevos avances en biotecnología, como el uso de especies *No-Saccharomyces*, inoculación simultánea de bacterias lácticas y levaduras o el control de *Brettanomyces* mediante nuevos polímeros naturales de origen fúngico, suponen alternativas naturales para el enólogo. En la presente comunicación presentamos algunos de estos avances con resultados en diferentes regiones vitivinícolas.

Palabras clave: *Non Saccharomyces*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Brettanomyces*.

1- INTRODUCCIÓN.

En el pasado, la fermentación era llevada a cabo por las levaduras salvajes presentes en la bodega, por ello la transformación de los azúcares en alcohol y la producción de compuestos aromáticos tenía lugar al azar, como resultado de un proceso aleatorio. Desviaciones aromáticas como el picado láctico, o problemas relacionados con el desarrollo de la fermentación eran frecuentes. La utilización de levaduras seleccionadas producidas

⁽¹⁾ Lallemand Península Ibérica. C/ Zurbano, 71. 28010. Madrid. España. jmheras@lallemand.com

⁽²⁾ Proenol. Travessa das Lages, 267 – Ap.547. 4405-194 Canelas- V.N. Gaia - Portugal.

en forma seca ha ido cambiando de forma gradual el control y la fiabilidad de las fermentaciones.

El estudio comparativo entre la ecología de las levaduras de las bodegas y del viñedo muestra claramente que las levaduras presentes en las uvas están sometidas a fenómenos naturales (maduración de la uva, variaciones meteorológicas), a la intervención del hombre y a los tratamientos fitosanitarios efectuados. También demuestra que las levaduras indígenas residuales no son las más adecuadas para la realización de la fermentación alcohólica. La utilización de inoculos seleccionados de *Saccharomyces* permite reducir las variaciones debidas al desarrollo de las poblaciones indígenas no controladas y asegurar un buen desarrollo de la fermentación alcohólica. Esto se traduce en una mejora de la calidad general de los vinos, al mismo tiempo que responde a exigencias tan actuales como la trazabilidad (LOISEAU *et al.*, 1987) y la coherencia de los procesos de producción (LAMBRECHTS y PRETORIUS, 2000).

Pero es importante considerar también la diversidad de la microflora de levaduras presente en los viñedos (MORTIMER y POLSINELLI, 1999), en los mostos (TORIJA *et al.*, 2001) así como durante las primeras fases de la vinificación (ZOTT *et al.*, 2008). La intervención de estos microorganismos de especies no-*saccharomyces* durante la fermentación alcohólica ha sido descrita en bibliografía (EGLI *et al.*, 1998).

Durante la vinificación, es posible tomar ventaja de la diversidad cuantitativa y cualitativa de los productos o subproductos de fermentación producidos por las levaduras no-*Saccharomyces* (CIANI y FERRARO, 1998). Gracias a esta biodiversidad, el enólogo puede diferenciar aun más su vino revelando el potencial aromático de los mostos, tanto a nivel de intensidad como de complejidad (ROJAS *et al.*, 2003), pero sin perder las ventajas que ofrece el control mediante la adición de levaduras. Algunas levaduras no-*Saccharomyces*, a la luz de los nuevos resultados científicos, presentan hoy en día interesantes características para las condiciones actuales en la elaboración de vinos de calidad.

Por otra parte, dentro de esta biodiversidad hay otras levaduras, como *Brettanomyces bruxellensis*, que pueden estar presentes y mermar la calidad del vino. Aceptada por la Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) como nueva práctica en el codex enológico en Julio de 2009 y por la Unión Europea en diciembre de 2010 (Regulation

EC 606/2009 Annex 1a), el quitosano de origen fúngico representa una innovadora y eficiente herramienta para el control de *Brettanomyces*. Estudios a escala de bodega han mostrado la efectividad del quitosano contra este microorganismo.

2 - INTERÉS DE LA ESPECIE *Torulaspora delbrueckii*.

Dentro de la biodiversidad natural presente sobre la uva y de los ecosistemas fermentativos, algunas especies han sido estudiadas de forma más específica a nivel de las fermentaciones enológicas por sus apreciados aportes organolépticos. Entre ellas podemos citar los géneros *Torulaspora*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y otros (CIANI y FERRARO, 1998; EGLI *et al.*, 1998, ROSI *et al.*, 1994). *Torulaspora delbrueckii* ha demostrado ser interesante no sólo por revelar la tipicidad sensorial, sino también por la pureza de su perfil fermentativo (MAURICIO *et al.*, 1991) y por su capacidad para corregir algunos defectos de los vinos como la acidez volátil (LANGUET *et al.*, 2005). En la naturaleza la variabilidad es la norma, ya sea inter o intra especies; la decisión de trabajar con una cepa de *Torulaspora delbrueckii* en particular fue tomada en colaboración con el INRA (Institut National de Recherche Agronomique, France), tras la realización de vinificaciones, seguimiento de la población de levaduras y análisis sensorial respetando todas las normas AFNOR (Association Française de Normalisation). (LANGUET *et al.*, 2005).

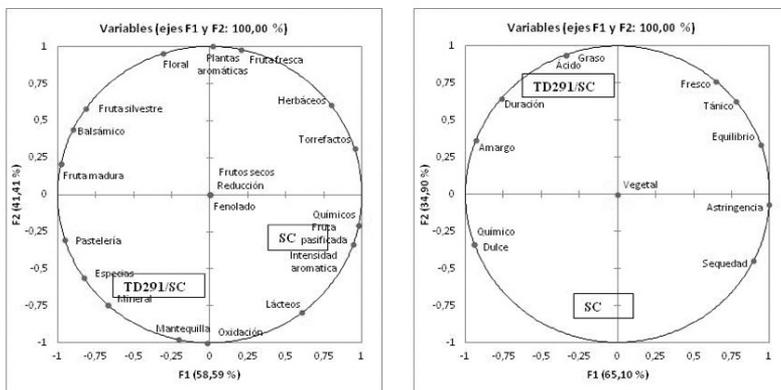
Las investigaciones y experiencias en bodegas durante estos años, han conducido a la puesta a punto de parejas de levaduras complementarias, que se utilizan en inoculación secuencial. Se trata de una levadura no-*Saccharomyces* de la especie *Torulaspora delbrueckii* 291, combinada con cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante la vendimia 2011 se realizó una experiencia con uvas de la variedad Touriga Nacional de la AOC Alentejo (Portugal) en una bodega del concelho de Reguengos de Monsaraz, se realizaron pruebas de vinificación comparativas. La uva fue despalillada y estrujada, y se dividió en dos depósitos de manera homogénea. En uno de ellos, se inoculó la *Torulaspora delbrueckii* 291 (Biodiva™) y una vez la fermentación había comenzado, se inoculó una *Saccharomyces cerevisiae* complementaria. En el otro depósito, se inoculó únicamente la *Saccharomyces cerevisiae*. La temperatura de maceración fue de 20°C. Una vez los vinos estaban secos, se trasegaron y se realizó la fermentación

maloláctica con bacteria seleccionada. Los vinos posteriormente fueron filtrados y embotellados.

Se llevó a cabo un análisis sensorial mediante sistema normalizado ISO 11035 con la utilización de descriptores consensuados y cuantificables con la participación de 5 cataadores cualificados y entrenados previamente al método y a los vinos a catar.

Figura 1. Representación de las variables (descriptores consensuados) y observaciones (muestras de vinos) en las fases olfativa (izda.) y gustativa (dcha.).



El vino donde se llevó a cabo la inoculación secuencial, fue considerado más complejo, con aromas de pastelería, especiados se y tonos minerales mientras que el vino testigo se caracterizaba más por los aromas a fruta pasificada, aromas químicos y alta intensidad en nariz. En la fase gustativa, se encontraron fuertes diferencias entre las muestras al igual que en la fase aromática. El vino con inoculación secuencial se relacionó con sensaciones grasas en boca, acidez y duración. El vino testigo se encontró con más sensaciones dulces y químicas.

3 - INTERÉS DE LA ESPECIE *Metschnikowia pulcherrima*.

Uno de los factores que más influyen en el aroma característico de una variedad de uva es su etapa de maduración. Tanto compuestos libres como ligados se acumulan en la

uva durante este periodo. Existen muchos compuestos aromáticos que se encuentran presentes en la uva, entre los cuales se destacan alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y terpenos. Sin embargo, los terpenos son los principales componentes responsables del aroma característico de los frutos. Una considerable parte de éstos se encuentran en forma ligada a azúcares impidiéndoles que formen parte del aroma del producto (GÜNATA et al. 1988). Estos terpenos glicosilados pueden ser transformados a su forma libre por la acción hidrolítica de enzimas glicosídicas. Los terpenos más destacados son: linalool, geraniol, nerol, citronerol y α -terpineol. La mayor parte de los residuos glicosídicos que acompañan a los precursores aromáticos son del tipo arabinofuranosidos y glicosidos (YANAI y SATO, 2000), es por esto que las enzimas con actividad α -arabinofuranosidasa y β -glucosidasa cobran gran importancia en la liberación de compuestos aromáticos volátiles. La primera enzima cataliza la hidrólisis del enlace entre la arabinosa y la glucosa, liberando el sustrato para la acción de la segunda enzima, la cual es capaz de hidrolizar la unión entre la glucosa y el terpeno, pasando este último a formar parte del aroma (GÜNATA et al. 1988). Diferentes estudios presentan la potencialidad de levaduras no-*Saccharomyces* para su uso en enología mediante el estudio de las enzimas que éstas secretan al medio (GANGA y MARTINEZ, 2004). En el marco de estos estudios, se seleccionó una cepa de la especie *Metschnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima* L1781) en la zona del Maule de Chile con capacidad de secretar una enzima con actividad α - arabinofuranosidasa al medio de cultivo. En experiencias realizadas en bodegas con esta levadura en forma seca activa y siguiendo la práctica de inoculación secuencial, se han validado estos resultados en relación a los aromas varietales e impacto organoléptico global.

En la vendimia 2011, se realizó una experiencia con uvas de la variedad Alvarinho de la AOC Vinho Verde (Portugal) en una bodega de la subregión de Vale do Ave. Tras las operaciones prefermentativas, el mosto se dividió de manera homogénea. En uno de los depósitos se inoculó con una levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada habitualmente en la bodega, y en otro se realizó la inoculación secuencial con *M. pulcherrima* L1781(Flavia™) y *Saccharomyces cerevisiae* complementaria. Una vez finalizadas las fermentaciones, los vinos fueron embotellados y se realizaron análisis de compuestos varietales aromáticos por C. Gases/Espectrometría de masas y análisis sensorial mediante sistema normalizado ISO 11035 con la utilización de descriptores consensua-

dos y cuantificables con la participación de 5 catadores cualificados y entrenados previamente al método y a los vinos a catar.

Figura 2. Unidades de aroma de compuestos aromáticos varietales ($\mu\text{g/l}$).

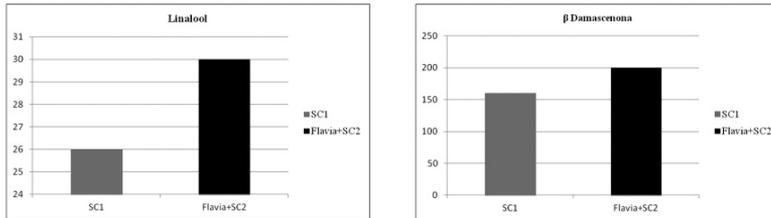
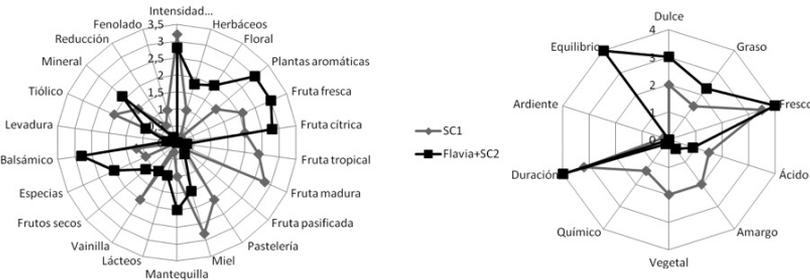


Figura 3. Representación de las variables (descriptores consensuados) y observaciones (muestras de vinos) en las fases olfativa (izda.) y gustativa (dcha.).



El vino con inoculación secuencial se relacionó en cata con descriptores varietales (floral, plantas aromáticas, cítricos) en concordancia con mayores niveles de estos compuestos, y una mejor percepción de volumen, equilibrio y longitud en boca.

4 – *Brettanomyces* nuevas herramientas de control.

Las consecuencias del desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* en los vinos suponen una grave amenaza para su calidad. Estas levaduras indeseables, que son capaces de desarrollarse en condiciones extremas (alta concentración de alcohol, carencia nutricional)

nal, altas concentraciones de SO₂, etc.) y durante el envejecimiento, son las responsables de la producción de compuestos aromáticos negativos, originados por los fenoles volátiles (4-etilfenol, 4-etilguayacol y 4-etilcatecol) caracterizados por aromas de tipo animal (caballo, corral, etc.), de farmacia (tirta, medicamento, etc.) y de tinta.

A nivel internacional, el volumen de vino afectado por este defecto es bastante importante. Diversos estudios demuestran que este defecto es detectado y rechazado tanto los profesionales como los consumidores.

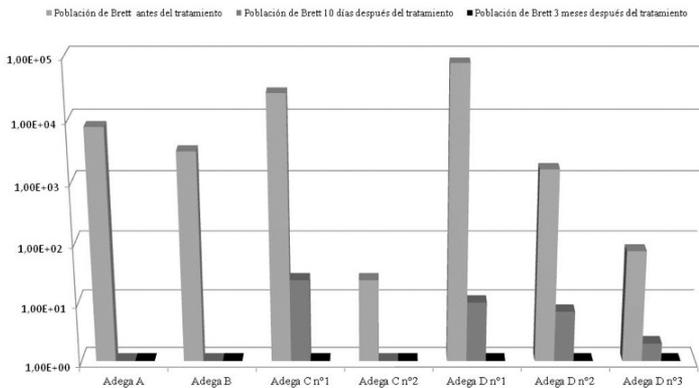
Incluso cuando se han tomado todas las medidas de prevención, todavía puede haber posibilidades de que las *Brettanomyces* alteren la calidad del vino acabado y llegar al cliente en malas condiciones. Si el enólogo se enfrenta a esta situación, tiene varias opciones, aunque hasta la fecha no se ha encontrado ninguna solución milagrosa.

El quitosano de origen fúngico, un polímero derivado de la quitina del *Aspergillus niger*, es efectivo para disminuir considerablemente la población de *Brettanomyces* de forma selectiva.

Al igual que el almidón, la celulosa y el colágeno, el quitosano es uno de los principales biopolímeros naturales. De hecho, el quitosano ya se utiliza en numerosos sectores por sus propiedades microbianas y de textura, de la agricultura a la alimentación y de la medicina a la cosmetología. La eficacia del quitosano de origen fúngico para reducir y eliminar grandes concentraciones de *Brettanomyces bruxellensis* ha sido confirmado por Aurélie Bornet (tesis doctoral 2006), así como muchos ensayos realizados en los últimos años en bodegas de diferentes áreas, que han contribuido al desarrollo y la validación de este producto. Se ha validado la dosis de 4g/hL, tras 10 días de contacto entre el quitosano de origen fúngico, llamado NoBrettInside™, y el vino. Los vinos tratados no muestran diferencias significativas en las pruebas dúo-trío en relación con los vinos de control, y cuando la diferencia se percibe, se prefiere sistemáticamente el vino tratado.

Durante el año 2011, se realizaron diferentes experiencias sobre vinos contaminados por *Brettanomyces* en distintas regiones de España y Portugal, donde se contrastó la efectividad del tratamiento, que se representan en la figura 4. El conocimiento adquirido a través de todas estas experiencias han permitido un mejor entendimiento del modo de acción del quitosano sobre las células de *Brettanomyces* (TAILLANDER et al. 2012).

Figura 4. Experiencias en bodegas en vinos contaminados por *Brettanomyces*. Datos de RT-PCR, antes y 10 días, 3 meses después del tratamiento con quitosano a la dosis de 4g/hl.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Bornet A. Utilisation des nouveaux auxiliaires technologiques en oenologie : chitine, chitosane et dérivés. Chimie analytique et bromatologie. *Université Montpellier I* (2006).
- Ciani, M. y L. Ferraro. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:247-254.
- Egli, C. M., W. D. Edinger, C. Mitrakul y T. Henick-Kling. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:779-789.
- Ganga, M. A. y C. Martínez. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:76-83.
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J. M., Mayonove, C. Cordonnier, R. (1988) Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. *Carbohydrate Research* 184, 139-149.
- Lambrechts, M. G. y I. S. Pretorius. 2000. Yeast and its importance to wine aroma review. *South*

- African Journal of Enology and Viticulture* 21:97-129.
- Languet, P., A. Ortiz-Julien, E. Aguera, A. Samson et J. M. Salmon. 2005. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des Œnologues* 117:31-33.
- Rojas, V., J. V. Gil, F. Piñaga y P. Manzanares. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food and Microbiology* 86(1-2):181-188.
- Rosi, I., M. Vinella y P. Domizio. 1994. Characterization of β -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77(5):519-527.
- Taillander, P., Blateyron, L., Bornet, A., Siczkowski, N., Heras, J., Granes, D. 2012. Le chitosane d'origine fongique. *Revue des Œnologues* 143:27-33.
- Torija, M. J., N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón y A. Mas. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4):345-352.
- Yanai, T., Sato, M. (2000) Purification and characterization of a novel α -L-Arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 1181-1188.
- Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel y I. Masneuf-Pomarede. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125(2):197-203.

A PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA EM PORTUGAL E A DIRECTIVA DO USO SUSTENTÁVEL DOS PESTICIDAS

Pedro AMARO¹

RESUMO

Além da preocupante evolução negativa da protecção integrada da vinha, desde 2008, analisa-se, quase em 1/1/14, a tentativa da Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN), com a **Proposta de Lei 82/XII**, quase eliminar a protecção integrada, na transposição da **Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, que tem o objectivo de promover o desenvolvimento da protecção integrada. A tentativa foi frustrada, parcialmente, pela intervenção da Assembleia da República ao elaborar a **Lei 26/2013**. O **Plano de destruição da protecção integrada, da AFN**, iniciado, em 1999, atingiu o auge com a PL 82/XII, que terá obtido o consenso de 28 entidades. As audições e a audiência na Assembleia da República esclareceram a gravidade desta problemática que parece visar até a eliminação da protecção integrada por travar a competitividade da agricultura nacional ao ser mais um **CRIVO** (de defesa da saúde e do ambiente) a reduzir perigosamente o nº de substâncias activas disponíveis. Esta hipótese é desmentida por dados da protecção integrada da vinha.

Palavras-chave: aplicação, formação, consenso, competitividade, assistência técnica

1 – INTRODUÇÃO

Em infeliz coincidência com a crise financeira e económica, atingiu-se, na UE, o auge da evolução da protecção das plantas, desde Outubro de 2009, com o Regulamento 1107/2009 da colocação dos pesticidas agrícolas no mercado e a Directiva 2009/128/CE do uso sustentável dos pesticidas, visando a **redução dos riscos dos pesticidas** para a saúde humana e o ambiente e o **fomento da protecção integrada**. Em 2005, com o

¹ Instituto Superior de Agronomia, Univ. Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, Lisboa 1349-017 Lisboa.
pedroamaro@netcabo.pt

conhecimento desta política da UE, já em fase decisiva de elaboração e debate destes diplomas, atingiu-se, em Portugal, significativo desenvolvimento da protecção integrada, e vivia-se a esperança de futura melhoria da qualidade para garantir a sustentabilidade (4).

A política de fomento da protecção integrada pela Directiva 91/414/CEE, nos anos 90, e o apoio das Medidas Agro-Ambientais proporcionaram o amplo desenvolvimento da protecção integrada, iniciado em 1994, e que, progressivamente, atingiu, em 2005, o apoio técnico a 22 000 agricultores em 220 000 ha de várias culturas por 443 técnicos de 112 organizações de agricultores (3 p.42,105, 9). Também foi prioritário e muito importante o investimento em **formação**, estágios e **campos de demonstração**, que Nicolau Galhardo, da DGADR, refere ter atingido, até 2000, **10%** dos 11,7 milhões de contos transferidos para os agricultores, o que “nunca se conseguiu em Portugal nada idêntico” (2 p.88). Enquanto em países, como Alemanha, Dinamarca, França, Holanda e Suécia, que pressionaram a UE para o desenvolvimento da protecção integrada, são frequentes as iniciativas para atingir este objectivo da UE, até nalguns, com a elaboração e divulgação, já em 2007-8, de Planos de Acção Nacionais do uso sustentável dos pesticidas, em Portugal intensificou-se, desde fins de 2005, em especial com o **Decreto-Lei 173/2005**, a **política oficial de destruição da protecção integrada**, liderada pela Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN) desde 1999, persistente, bem organizada, e que parece ser apoiada, em claro e declarado consenso, por **28** entidades oficiais e privadas (28) (ver 4 e 5).

Esta política da AFN atingiu o auge com a transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas, pela **Proposta de Lei 82/XII**, em que quási se elimina a protecção integrada, o que foi evitado, na Assembleia da República (AR), com a **Lei 16/2013**, mas de forma deficiente e muito incompleta (ver 3).

Esta problemática é ainda mais preocupante, ao verificar que estes acontecimentos ocorrem, ultrapassadas, há muito, as fases, a nível político/administrativo, de **maior crédito** da AFN, que justificaram a criação de duas Direcções Gerais, a **DGPPA em 1977** e a **DGPC em 1996**. Hoje, a **protecção das plantas está reduzida a escassas Secções** da Direcção Geral de Alimentação e Ambiente, o que exige urgente reestruturação, “sonho” certamente impossível em plena crise financeira e económica, antes referida.

2 - A PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA, EM PORTUGAL, EM PREOCUPANTE DEGRADAÇÃO, QUÁSI EM 1/1/14

Num inquérito, verificou-se, que a **área de protecção integrada da vinha**, com predomínio de **PRODI** (com **certificação**), em **2012**, foi:

- no conjunto de **34** organizações de agricultores, de **38 341 ha**, de **4199** agricultores;
- segundo 5 organismos de certificação, de **41 387 ha**, de **4024** agricultores (17).

Relativamente à **área oficial de protecção integrada**, em **2012**, de **362 100 ha** (28), estas áreas correspondem a **11%** (10,6 – 11,4), o que evidencia a **enorme dimensão do declínio da protecção integrada da vinha**, que, em **2003**, atingiu a posição cimeira de **56%** em PI e **70%** em PRODI (3, 17). Esta triste situação é confirmada pela “percepção” da CONFAGRI quanto às cooperativas: *“hoje serão muito poucas as Adeegas que apoiam os viticultores nas áreas da protecção integrada e da produção integrada”* (17, 24).

A **redução**, em **2012**, relativamente a **2004** (Quadro 1), foi de:

- **56%** da **área** de protecção integrada ou PRODI da vinha;
- **76%** do nº de **agricultores**;
- **61%** do nº de **técnicos** para apoio aos agricultores.

Quadro 1 - A redução de **área** (ha), de **agricultores** (nº) e de **técnicos** (nº) para apoio aos agricultores em **protecção integrada** ou **PRODI** da vinha, entre 2003/04 e 2012 (3, 17)

Tema		2003/4	2012	Redução %
Área	ha	88 059 *	38 341	56
Agricultor	nº	17 769	4199	76
Técnico	nº	331	128	61
*2003				

A novidade da expansão da **certificação**, no PRODI, é **muito positiva** pelas esperanças de melhor **qualidade** que implica, mas é indispensável a realização de **rigorosa avaliação**, o que raramente é prioritário e acontece a nível oficial ou privado.

3 - A TENTATIVA DE QUÁSI ELIMINAR A PROTECÇÃO INTEGRADA NA TRANSPOSIÇÃO DA DIRECTIVA DO USO SUSTENTÁVEL DOS PESTICIDAS

3.1 - A Directiva do uso sustentável dos pesticidas

Desde 1992, a Comissão Europeia deu início à elaboração de estudos visando esta Directiva. Há quasi 11 anos, em **1/7/02**, a Comissão Europeia divulgou: “**Para uma estratégia temática do uso sustentável dos pesticidas**” (22), enviada ao Conselho, ao Parlamento e ao Comité Económico e Social. No **Objectivo 4 – Incentivar a adesão a uma agricultura que utilize quantidades limitadas ou nulas de pesticidas, nomeadamente...**, refere-se “desenvolvendo os códigos de boas práticas agrícolas que **integram os princípios da protecção integrada**”.

Decorridos 4 anos de amplo debate, surgiu, em **12/7/06**, por iniciativa da CE, a “**Estratégia temática para o uso sustentável dos pesticidas**” (23) esclarecendo as **Medidas** a adotar para assegurar os 5 Objectivos. Relativamente ao 5º Objectivo, refere-se: “Os Estados-Membros devem **criar as condições necessárias para a aplicação dos princípios da protecção integrada** contra os seus inimigos, de modo a que passem a ser **obrigatórios O MAIS TARDAR em 1/1/14**”. E já haviam decorrido **6 anos**, em **5/7/12** (ver 3.2).

A **Proposta de Directiva do uso sustentável dos pesticidas** é também divulgada em **12/7/06**. No art. 13º - Protecção integrada, com 8 questões algo semelhantes às do actual art. 14º da Directiva, determina-se que os EM assegurem, **o MAIS TARDAR em 1/1/14**, que **os utilizadores profissionais pratiquem os princípios gerais da protecção integrada**.

Esta questão foi analisada em 2007 e 2009 e recorda-se que “ O Parlamento Europeu procedeu, em **23/10/07**, à 1º votação das propostas da Comissão Europeia relativas ao Regulamento (substituição da Directiva 91/414/CEE) e à **Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, com mais de 1000 alterações...” (5 p.20-22). ”Através de um processo

respeitando as virtudes da democracia foi obtido, em 17/12/08, o acordo, entre o Conselho e representantes do Parlamento, que proporcionou a votação no Parlamento, em 31/1/09, dos dois diplomas, por clara maioria de 88% (6 p.27). Depois, a **Directiva 2009/128/CE foi aprovada pelo Conselho em 21/10/09 e divulgada em 24/11/09.**

Esta Directiva evidencia o Objectivo de **fomentar a protecção integrada**: no Objecto (art. 1º); nas Definições (art. 3º.6); nos Planos de acção nacionais (PAN) (art 4º.1); nos Indicadores de risco (art. 16º.2c); no Intercâmbio de informações (art. 18º); e em **5 Medidas do art. 14º - Protecção integrada** para assegurar a prática da protecção integrada):

- (1) **Condições necessárias** (como Informações e Instrumentos de monitorização dos inimigos das culturas e para a tomada de decisões e Serviços de aconselhamento);
- (2) **Baixa utilização de pesticidas**;
- (3) **Incentivos**;
- (4) Alterações ao Anexo III – **Princípios gerais da protecção integrada**;
- (5,6) e duas importantes METAS:

- até 30/6/13 – o envio, à COMISSÃO, do RELATÓRIO sobre se estão reunidas as condições necessárias para a aplicação da **protecção integrada**;
- até 1/1/14 – **certificar** que os **princípios gerais da protecção integrada** são aplicados por **todos** os utilizadores profissionais (10,11, 12, 14, 15, 16).

3.2 – A **quási eliminação da protecção integrada, na transposição da Directiva, pela Proposta de Lei 82/XII**

A **Proposta de Lei 82/XII eliminou a protecção integrada (até o art. 14º - Protecção integrada)**, referida na Directiva, à excepção do Anexo II e de **2 artigos (3% de 70 artigos)**:

- art. 51º.1, sem rigor, eliminando “a introdução” nos PAN (art. 4º.1a da Directiva);
- art.16º.1d, referindo “**A PARTIR de 1/1/14, seguir os princípios da protecção integrada...**”, mas deturpando, ao eliminar “descrever nos PAN a forma **como se certificam de que os princípios gerais da protecção inte-**

grada... são aplicados por TODOS os utilizadores profissionais ATÉ 1/1/14” (art. 14º.4 da Directiva).

E a **Lei 26/2013** surpreende ao tentar esclarecer esta **confusão**, nos:

- art. 51º.2 - Os PAN devem assegurar que os princípios gerais da protecção integrada... são aplicados por TODOS os utilizadores profissionais ATÉ 1/1/14.
- art. 16º.1f. - A **PARTIR** de 1/1/14, considerar os princípios da protecção integrada...

A PL 82/XII, em **48 Omissões**, em artigos e no Preâmbulo da Directiva (cerca de **35%** do texto da **Directiva**), abrange, além das referidas omissões da protecção integrada, outras 17 sobre: PAN; redução do impacto da perigosidade dos pesticidas; redução do uso ou dos riscos da toxicidade dos pesticidas em zonas específicas; informação e sensibilização e, ainda, **9 Definições** (10, 11, 15, 16).

A boa prática fitossanitária (**BPF**), **nunca** referida na Directiva, por não assegurar a indispensável redução dos riscos da toxicidade dos pesticidas, ignorando **87%** das 7 exigências da protecção integrada, surge na **transposição** da Directiva, em 4 temas, 2 em exclusividade e na Definição (art. 3º.g) (10, 11, 15).

Após 6 meses de debate da PL82/XII, na AR, foram recuperados, pelos deputados, alguns artigos da Directiva, da maior importância sobre protecção integrada, como o **objecto** (art 1º), a **definição** (art.3º.6) e **4 temas** (1,2,4,5) do eliminado **art. 14º**.

Sem aparentes razões ideológicas, os deputados dos partidos do Governo e até do PS e do Bloco de Esquerda mantiveram-se insensíveis a alterações relativas:

- a eliminar a mistura “incompatível” da revisão do Decreto- Lei 173/2005 (**com BPF e sem PI**) com a transposição da Directiva (**com PI e sem BPF**) (16);
- a impedir a eliminação do art. 14º e das referências à protecção integrada nos art. 14º.3, 14º.4 e, ainda, no art. 15º.2;
- à persistente obsessão da BPF, com 4 referências e, até no art. 20º.c, em exclusividade, apesar da **BPF** ser “proibida” na Directiva, por **deficiente defesa dos riscos de toxicidade dos pesticidas**, o que não impediu de estar

sempre presente no **PLANO da AFN de destruição da protecção integrada** (ver 4) (10, 11);

- e à correcção de **16 omissões**, que persistem, relativas: **3** (art.14º.3, 14º.4b, 15º.2c) à protecção integrada; **5** (art.4º:1a,1b,1c,1d,1e) aos PAN; **5** à defesa dos riscos de toxicidade dos pesticidas (art. 2º.3, 7º.1, 7º.2), informação ao público (art. 15º.3) e zonas específicas (art. 12º); e **3** a eliminadas definições (indicador de risco, pesticida e biocida) (10, 11).

A **Proposta de Lei 82/XII**, para transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas, elaborada pela AFN, foi enviada, pelo Governo, à Assembleia da República (AR), em **5/7/12**, foi debatida na especialidade, na Comissão de Agricultura e Mar, a revisão foi aprovada em **15/2/13** e a **Lei nº 16/2012** foi publicada em **11/4/13**, cerca de **10 meses** após 5/7/12. Esta Lei surgiu a cerca de **9 meses** da já célebre data de **1/1/14**, referida no art. 14º.4 da Directiva do uso sustentável dos pesticidas: “**os princípios gerais da protecção integrada...são aplicados por todos os utilizadores profissionais ATÉ 1/1/14**”,

A **Lei 26/XII** atenuou a **quási eliminação da protecção integrada**, lamentável objetivo da AFN, bem evidente na **PL 82/XII**, mas, infelizmente, **foram ignoradas muito importantes omissões**, antes referidas.

Não se vislumbram razões ideológicas para **só** o Partido Comunista, o Bloco de Esquerda e os Verdes, com a abstenção em 13/7/12, terem **forçado o debate na especialidade** da PL 82/XII e também para o PC e os Verdes serem os **únicos** Partidos a apoiar, em 15/2/13, as propostas de Pedro Amaro (ex: 11, 12) que visaram eliminar todas as omissões e a acção maléfica da mistura da Directiva (com PI/sem BPF) com a revisão do Decreto-Lei 173/2005 (sem PI/com BPF). Assim, se ignorou que, obviamente, a **PL 82/XII** foi o “**Cavalo de Troia**”, citado pelo Prof. António Mexia, na audição de 12/10/12 (ver 6).

4 - O PLANO DA AFN DE DESTRUIÇÃO DA PROTECÇÃO INTEGRADA

A análise, ao longo de **6 meses**, da **Proposta de Lei 82/XII** que procede à transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas, em debate na Assembleia da República,

proporcionou, progressivamente, em 12 documentos (5 (10-14) referidos nesta comunicação), a evidência das **5 Fases do PLANO da Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN) de destruição da protecção integrada** (Figura 1):

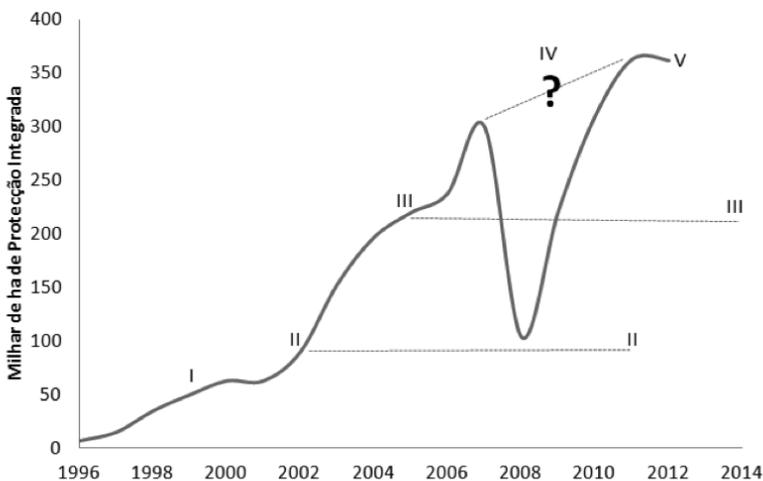


Figura 1 – O Plano da AFN de destruição da protecção integrada (13, 14, 15, 16, 18)

I – desde 1999, com a Mentira da BPF=**Melhores práticas** de protecção das plantas;
II - de 2002 a 2011, com a **FORMAÇÃO** quási só **limitada à BPF**;
III - desde 2005 até 1/1/14 (art. 16°.1a e 16°.1d da **PL 82/XII**), com a **TOMADA DE DECISÃO** e a **APLICAÇÃO** de produtos fitofarmacêuticos **limitadas à BPF**;
IV - desde 2007 até 23/11/12 (28), a “**esconder**” a **ÁREA** de **protecção integrada**;
V - em 5/7/12, a **PL 82/XII elimina** praticamente a **protecção integrada**, na **transposição** da Directiva do uso sustentável dos pesticidas.

5 - O CONSENSO DE 28 ENTIDADES, NA TRANSPOSIÇÃO DA DIRECTIVA DO USO SUSTENTÁVEL DOS PESTICIDAS

5.1 – Os pareceres solicitados pela AFN e outras intervenções de 28 entidades
A AFN solicitou pareceres sobre a PL 82/XII a 28 entidades, mas **só 6** (ACRA, Asso-

ciação dos Consumidores da Região dos Açores, ALRRA, Assembleia Legislativa da Região dos Açores, ALRAM, Assembleia Legislativa da Região da Madeira, DECO, DGC- Direcção Geral do Consumo e UGC-União Geral dos Consumidores) foram divulgados, no portal da CPAM - Comissão Parlamentar de Agricultura e Mar, As entidades sem pareceres são 15 oficiais e 7 privadas. A Ministra de Agricultura e do Ambiente, em resposta à Pergunta nº 342/XII/2, da Assembleia da Republica, esclareceu:

“O **processo** de criação da Proposta de Lei foi bastante longo (**iniciado em 2010**) e envolveu **inúmeras entidades com conhecimento e intervenção na matéria**...A Proposta de Lei resulta, então, de um **amplo consenso**” (28).

Certamente no âmbito do referido “**Processo**”, realizou-se, entre 22/11/10 e 15/12/10, o **Debate público** do Projecto de revisão do Decreto-Lei 173/2005, ”transpondo para a ordem jurídica interna, na parte relativa à formação, venda e aplicação de produtos fitofarmacêuticos, os artigos 5º, 6º, 7º, 11º e 13º da Directiva 2009/128/CE”. Pedro Amaro, por mero acaso, teve conhecimento, em Anadia, deste Debate e apresentou 6 Propostas de alteração relativas a: 1ª - **Protecção integrada/BPF**; 2ª - **Categorias de perigosidade de pesticidas**; 3ª – Protecção do **ambiente aquático** e da **água potável**; 4ª – Riscos dos pesticidas em **zonas específicas**; 5ª – Deficiências da **informação oficial**; 6ª – ilegalidades na **publicidade de pesticidas** (7). Obviamente estas 6 Propostas foram ignoradas na Revisão do Decrceto-Lei 173/2005 concretizada na PL 86/XII.

Houve, ainda, uma audiência da ANIPLA, em 10/10/12, e audições de 5 Confederações de agricultores (AJAP, CAP, CNA, CNJ e CONFAGRI), em 4/12/12 e de António Mexia e Pedro Amaro do ISA e de Miriam Cavaco da AFN (DGAV), em 12/10/12. A análise dos 6 pareceres, divulgados no portal da CPAM, evidenciou a total ausência de referência à protecção integrada e a preocupação com os riscos da toxicidade dos pesticidas só em 3 entidades (ACRA, DGC e UGC). As outras 3 entidades nada referem, como ocorreu no parecer da **DECO**:

“O presente documento está bastante completo... E uma vez que a presente proposta nos parece **positiva e adequada** às **necessidades atuais**, **não temos alterações a propor**” (27).

Que **fundamentado e valioso consenso!!!** E ignora-se a natureza do **consenso**, nos 22 pareceres **não** enviados à AR!

5.2 – As audições na Assembleia da República das 5 Confederações, em 4/12/12

“Os **agricultores** são as maiores vítimas do risco **inaceitável** do uso dos pesticidas, a prevenir pela **protecção integrada**” (14).

É esclarecedor e muito preocupante verificar que, nas audições das **5 Confederações**, foi **quási sempre ignorado** o facto da **PL 82/XII eliminar a protecção integrada** **quási totalmente** (ver 3.2).

Só a **CONFAGRI** foi **excepção** nesta **eliminação**, com 3 questões da **maior importância**:

- “a transposição da Directiva deve **restringir-se, exclusivamente, ao objecto da mesma**.” ;
- “Relativamente à **questão dos princípios da protecção integrada**... importa referir que a directiva impondo a obrigatoriedade de seguir, a partir de 1/1/14, os princípios da protecção integrada, define paralelamente que os Estados-Membros criem ou apoiem as **condições necessárias** para tal aplicação” (informações, instrumentos de monitorização e para apoio à tomada de decisão e serviços de aconselhamento).” Ora, esta legislação **omite por completo** as obrigações do Estado nesta matéria fixando-se unicamente nas obrigações dos produtores”.... “Assim desde já **solicitamos** que na **proposta de Lei** sejam incluídas medidas de apoio às **condições necessárias ao desenvolvimento dos princípios da protecção integrada**”;
- “o Estado, nos últimos anos, apenas conseguiu **promover o desmantelamento do regime que apoiava a adesão dos agricultores à protecção integrada, assim como das organizações que prestavam apoio a esses agricultores**. E, sendo conhecida esta obrigação, **desde o ano de 2009**, ano de publicação da Directiva n.º 2009/128/CE, **nada foi feito nem nada é mencionado nesta Proposta de Lei**” (14, 24).

A **AJAP** “**considera deveras importante**, enquanto medida de redução do risco na aplicação de produtos fitofarmacêuticos, a **obrigatoriedade de os agricultores aplicarem os princípios da protecção integrada**”, mas evidenciou fundamentadas preocupações quanto ao **apoio técnico ao agricultor** e às “**garantias de um cumprimento efectivo dos princípios da protecção integrada**”. Coerentemente, teve a **exclusividade** de abordar as decisivas e muito importantes actividades de **FORMAÇÃO e de ASSISTÊNCIA TÉCNICA em protecção integrada**:

- “a **formação em protecção integrada** foi inequivocamente descurada no PRODER e não temos agricultores dotados de conhecimentos determinantes para a aplicação da protecção integrada”;
- “no PRODER, **Portugal desistiu de um trabalho de anos**, cessando com a obrigatoriedade da **assistência técnica**”;
- “o desenvolvimento da **protecção integrada** e de abordagens ou técnicas alternativas ... **só é possível com apoio técnico** e nunca apenas por imposição legislativa a partir de 1/1/14”;
- “as entidades responsáveis pela assistência técnica foram **forçadas a dispensar técnicos qualificados** que estavam a conferir um importante apoio aos agricultores, com perdas avultadas para o sector, uma vez que o trabalho desenvolvido, em parte foi revertido”;
- “a **assistência técnica** conferida aos agricultores no âmbito da protecção e produção integrada, em anteriores quadros comunitários, representou inequivocamente uma mais-valia para o sector...” sendo de “salientar a importância do papel desempenhado pelos técnicos das associações (devidamente credenciadas) que ultrapassava o âmbito da contratualização, a sua forma de actuação constituiu uma consistente **extensão rural**, papel abandonado pelo Estado”
- “o PRODER **eliminou a protecção integrada** e manteve apoios à produção integrada com um elevado nível de exigências e com um número de beneficiários consideravelmente inferior relativamente ao RURIS” (1, 14)..

A inconveniente redução do número de substâncias activas disponíveis, em consequência das **proibições da protecção integrada para defesa da saúde e do ambiente**, foi motivo de breve referência da CONFAGFI e de grave preocupação da CAP.

A **CONFAGRI** refere: “caso haja a obrigação da adopção das normas da protecção integrada, o leque de produtos fitofarmacêuticos disponíveis irá reduzir-se significativamente, porque deixarão de estar disponíveis 222 substâncias activas (nem todas ... são permitidas em PI, e muitas são-no com restrições à sua utilização)” (14, 24).

A **CAP** manifestou: o **SIM**: “à imposição de, a partir de 2014, todos os agricultores

terem de seguir os princípios da protecção integrada na actividade agrícola”, mas com o **NÃO**: “no entanto, este facto **não** pode comprometer o combate a novas pragas e doenças que, infelizmente e cada vez mais, assolam as nossas culturas”.

E justifica as reservas aos critérios de selecção de pesticidas que reduzem o número de substâncias activas:

- “o novo quadro de homologação de produtos fitofarmacêuticos existente é já bastante exigente e restritivo no que toca à utilização de vários tipos de substâncias...”;
- ” a revisão da Directiva 91/414/CEE... veio trazer alguns impactos negativos no combate a pragas e doenças nas culturas, dado que o número de produtos fitofarmacêuticos disponíveis no mercado acabou por ser significativamente reduzido”;
- “após a retirada de inúmeras substâncias activas do mercado que se verificou, a situação fitossanitária de muitas culturas complicou-se drasticamente, pelo facto de terem ficado deficientemente cobertas muitas pragas e doenças, sem que houvesse possibilidade de as combater de uma forma eficaz.” (14, 21)

A **CNA**, na única referência à **protecção integrada**, esclarece que o cumprimento do artigo 16º.1d “impõe a necessidade de formação e divulgação de normas técnicas relacionadas com as **exigências da protecção integrada** junto dos agricultores” (14, 25).

A **CNJ** ignorou a protecção integrada (14, 26).

5.3 – A audiência da ANIPLA na Assembleia da República, em 10/10/12 (14, 19)

A **ANIPLA**, Associação com 13 empresas e mais de **95%** do Mercado nacional dos pesticidas de **120 milhões de €**, em 2011, **ignorou a protecção integrada** e considerou que o uso dos pesticidas, **só com a BPE**, satisfaz os requisitos de segurança exigidos na UE (entidade que **eliminou a BPF na Directiva**, por ignorar **87%** das 7 exigências da protecção integrada) (ver 3.2) e refere que o “**aconselhamento agrícola** é praticamente inexistente, mas o aconselhamento é assegurado pelas empresas de PF”.

Na análise da “**Directiva do uso sustentável**” (dos **pesticidas**, pormenor **eliminado** por

exigência do **tabu** (5 p. 106-108), a ANIPLA refere que a Directiva é “essencial para:

- (1) regulamentar a correcta utilização dos PF;
- (2) reduzir o risco do uso de PF;
- (3) ajudar a preconizar boas práticas agrícolas;
- (4) o desenvolvimento de um Plano de Acção Nacional”.

“E, em simultâneo, tem que assegurar a **COMPETITIVIDADE** da Agricultura Nacional versus os parceiros da UE e países terceiros”.

A ANIPLA ignora: **a omissão da protecção integrada** como o **2º objectivo da Directiva**; e do seu **artigo 14º**, tão importante, em especial, para as alíneas 1, 2, 3, 4, antes referidas.

A ANIPLA só refere a **protecção integrada**, para discordar dos actuais “**critérios de selecção de produtos** para uso em protecção integrada, que:

- são desajustados (a quê?) e representam um **2º CRIVO** (ignora a justificação de **defesa da saúde e do ambiente**, realçada na Directiva);
- levam à ausência de meios de combate a pragas e doenças de várias culturas;
- são responsáveis por problemas de **COMPETITIVIDADE**, por critérios mais restritivos comparativamente com outros EM da ZONA SUL da UE” (em contraste com a opinião da AFN e de Pedro Amaro (8 p.113-114), na audição de 12/10/12).

A ANIPLA considera que “**a Lei actualmente em vigor (173/2005) satisfaz os requisitos de segurança exigidos na UE**” e “cumpre **critérios rigorosos** de segurança para o Homem e o Ambiente”!!! Mas esta Lei substituiu a protecção integrada pela BPF!!! (ver 3.2 e 4). A segurança defendida pela ANIPLA **não é a mesma da UE**, que, em 21/10/09, aprovou a Directiva do uso sustentável dos pesticidas, que **exclue a BPF**, certamente, por não respeitar **87%** das 7 exigências da protecção integrada.

A ANIPLA ignora a **protecção integrada** na **Fiscalização** e nas **Conclusões**. De facto, a **protecção integrada** não é uma das “Principais Preocupações da Indústria”... em Portugal!

6 - AS AUDIÇÕES NA ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA DE ANTÓNIO MEXIA (AM) E PEDRO AMARO (PA) DO ISA E MIRIAM CAVACO (MC) DA AFN (14)

A drástica **ausência de informação relativa à protecção integrada** e não só, na **Proposta de Lei 82/XII**, havia sido alertada aos Grupos parlamentares (10, 11, 12,13), e foi referida na audição e pormenorizada, por PA, quanto a 3 artigos da Directiva: Objecto (art. 1º); Definição (art. 3º); e **todo o art. 14º- Protecção integrada**, que define as **Medidas a adoptar** para assegurar a **obrigatoriedade da protecção integrada**; e, ainda, a **70% das referências** da Directiva à protecção integrada; e até a **35% do texto** da Directiva. PA apelou aos: “Senhores deputados, façam substituir a **vergonha que é a Proposta de Lei** que é uma mentira e é um **acto perfeitamente consciente de destruir a protecção integrada**, aquilo por que luto desde 1977”.

AM referiu que a Proposta de Lei aparece como o **Cavalo de Troia** (ver 3.2) e é incompreensível, nos termos em que está formulada, e que **o art. 14º desapareceu** porque a protecção integrada foi esquecida ou abandonada e realçou a urgência da manutenção dos princípios, apelando a que não se permita que o espírito da Directiva seja prevertido.

AM não aceita que perdue na AFN o espírito:

- de ser preferível que os agricultores ignorem as características cancerígenas, mutagénicas e tóxicas para a reprodução;
- de considerar **inaceitável** que a Comissão Europeia queira **obrigar** a Comunidade Europeia à **prática da protecção integrada** por todos os utilizadores profissionais.

Depois, MC, **ignorando a eliminação da protecção integrada no Objecto (art.1º)**, referiu que a Definição, ausente na Proposta de Lei, está no Decreto-Lei 256/2009, mas “possivelmente não ficará mal na Proposta de Lei... será mesmo uma mais-valia para a transposição da Directiva”. MC afirmou, ainda, que “o artigo 14º da Directiva está transposto na Proposta de Lei 82/XII, se analisarmos... o que está no art. 51º, mas ele não pode ser analisado isoladamente, tem que ser analisado com o que está no Decreto-Lei 256/2009”.

Mas, no Decreto-Lei 256/2009, nada é referido sobre os temas da protecção integrada do art. 14º da Directiva. Tais **fantasias** justificaram, nova intervenção de PA: “Discordo totalmente do que foi dito por MC. Só quem é cego é que não vê, mas não engana nin-

guém”. “Há 3 anos que sistematicamente se mata a protecção integrada. Aprovar qualquer coisa parecida com a Proposta de Lei é um crime à protecção integrada, à protecção das plantas, à saúde e ao ambiente deste País“. A resposta de MC foi o SILÊNCIO!

Estas fantasias não podem ignorar que, **só em 2 artigos** da Proposta de Lei, se refere a protecção integrada:

- no art. 51º.1 “incompleto” e relativo ao Plano de Ação Nacional;
- no art.16º.1d, **deturpando** o tão importante art.14º.4 da Directiva (ver 3.2).

MC nada respondeu, quando questionada, por 2 vezes, por PA, sobre a ausência de informação relativa à área de protecção integrada, desde 2008.

7- A REDUÇÃO DO NÚMERO DE SUBSTÂNCIAS ACIVAS PELAS PROIBIÇÕES DO CRIVO DA PROTECÇÃO INTEGRADA (8, 17)

7.1 – O progresso, em Portugal, graças a Medidas da política da UE

Nos anos 90, do início da concretização da Directiva 91/414/CEE, o consumo de pesticidas foi estacionário na UE, mas Portugal evidenciou a posição ímpar, no conjunto de 27 países da OCDE, com o aumento de 100% e só depois Turquia, Polónia e Grécia, com 40%.

A evolução do nº de s.a. Simples, fungicidas, herbicidas e insecticidas foi **crescente** entre 1970 (139) e 2002 (**292**), com redução até 2005 (261) e **aumento** até 2011 (**279**).

Em 2011, o total de s.a. Simples foi **242** e não 216 (como refere 29), correspondente a **69%** das **353** s.a. autorizadas, em 9/9/11, na UE. O total de s.a. Simples + s.a. Misturas foi **306 (8)**.

O exemplo da vinha é significativo, ao predominar com 77,4%, entre 1992 e 2003, no consumo de pesticidas em Portugal.

A reavaliação dos pesticidas pela Directiva 91/414/CEE **NÃO impediu o aumento**:

- de s.a. **homologadas** para vinha de 24%, entre 1989 e 1997 e de 3%, de 1997 a 2012;
- de s.a. **autorizadas em protecção integrada** da vinha, de **32%**, entre 1997 e 2012.

Finalmente, e muito esclarecedor da “**Desgraça**” da **redução do nº de s.a. disponíveis** causada pelas recentes proibições do **CRIVO (para defesa da saúde e o ambiente)** da protecção integrada, verificou-se, entre 1997 e 2012, a grande **redução de 63%** no nº de s.a. **PROIBIDAS** em protecção integrada da vinha. E, entre **2005 e 2012**, a redução no nº de s.a. foi de 20 para 15, isto é de **25%**.

Também é muito importante e esclarecedor recordar os **progressos**, nas **MAIS AMPLAS E RÁPIDAS AUTORIZAÇÕES DE PESTICIDAS**, proporcionadas pela Directiva 91/414/CEE e reforçadas pelo Regulamento 1107/2009:

- alargamento de espectro para **usos menores**, desde 2004, já com **581**, em 2007 e que atingiu “**mais de um milhar**”(mais rigor é desejável) nos últimos 5 anos;
- finalidades não cobertas em usos considerados **maiores**, desde 2006, com mais **40**, em 2011, e o total **246**;
- **reconhecimento mútuo**, desde Abril de 2009 e **40** autorizações de venda até 31 /12/11.
- é também muito significativo que “Portugal seja, em **2011**, o 2º Estado-Membro com o **maior nº de derrogações** temporárias ao uso de pesticidas proibidos, por determinado tempo, apenas superado pela França” (20).

7.2 – O pessimismo desmentido pela realidade

A Comissão Europeia, em **13/3/09**, divulgou os resultados do Programa de reavaliação das **1004** s.a.: **26%** aprovadas, **7%** proibidas por **risco inaceitável** e **67%** excluídas por a Indústria dos pesticidas ter desistido da investigação indispensável á avaliação do seu risco para a saúde e o ambiente. **Excelente iniciativa** que libertou a UE de tantas s.a. perigosas ou potencialmente perigosas!

A **AFN**, desde **2000**, começou a manifestar, no Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos orodutos fitofarmacêuticos, a preocupação da influência da reavaliação dos pesticidas na redução do nº de s.a. em Portugal, esclarecendo que “ muitas das s.a. autorizadas nos outros países mediterrânicos não se encontram no mercado nacional. Este facto deve-se a várias razões, nomeadamente, á dimensão do mercado nacional, á estratégia das empresas ou a critérios de avaliação mais exigentes, em termos de defesa

da saúde pública e do ambiente ou agronómicos, adoptados pelas entidades nacionais”. E a AFN referiu que, a par de **273** s.a. em Portugal, em 1/1/2000, “à data de 5/2/99, existiam **849** s.a. no mercado da UE, das quais **541 em Espanha, 538 em França, 397 em Itália e 410 na Grécia**. A grande maioria das s.a. homologadas em Portugal estão, igualmente, nos mercados dos outros países mediterrânicos”.

É esclarecedor verificar que Portugal tinha **32%** das s.a. da UE, em **2000** e que 11 anos depois, em **2011**, tem **69%**, **um aumento só de 116%!** E há quem grite: O **CRIVO** da **protecção integrada às s.a. disponíveis desgraça a COMPETITIVIDADE em Portugal!!!**

A AFN, nos Guias de produtos fitofarmacêuticos, desde **2000 a 2008**, começou a alertar:

“prevê-se um espectro de s.a. e de produtos formulados que não contemple usos importantes nos países mediterrânicos, incluindo Portugal, e portanto sem solução fitossanitária através da aplicação de produtos fitofarmacêuticos”.

A AFN, desde **2009 até 2012**, nestes Guias, **aumentou o ALARME**:

“a protecção das plantas na **agricultura mediterrânica**, sendo de grade exigência e especificidade, está a ser confrontada com **dificuldades crescentes** em termos de **cobertura de usos**, incluindo usos **importantes**” (29, p. 13).

Além da **vinha**, que desmente estes ALARMES, não se dispõe de informação relativamente a **outras culturas**. Seria desejável os **arautos da “Desgraça” da falta de s. a.** a justificarem os seus **“alarmes”** com **dados**, como os referidos para a vinha.

8 – CONCLUSÕES

- A **REDUÇÃO da protecção integrada da vinha** em **2012**, em relação a **2003**, foi de: **56%** da **área** de Protecção integrada ou PRODI; **76%** do nº de **agricultores** e **61%** do nº de **técnicos** (ver 2).

- A **Directiva do uso sustentável dos pesticidas** fomenta o desenvolvimento da protecção integrada, como já se previa, em 1/7/02, na Estratégia temática do uso sustentável dos pesticidas e foi aprovada, com a **maioria de 88%** no Parlamento Europeu, em 21/10/09. Segundo o **Plano da AFN de destruição da protecção integrada**, a **transposição** da Directiva, pela **Proposta de Lei 82/ XII**, **quási eliminou a protecção integrada**, reduzida a 2 artigos, o 51º.1 sem rigor e o 16º.1d **deturpado**. As omissões ocorreram, nomeadamente, no Objecto (art. 1º), nas Definições (art. 3º.6) e nas **Medidas para assegurar a prática da protecção integrada** (art. 14º). A decisão final, na **Lei 26/XII**, de 11/4/13, só corrigiu algumas questões de maior importância, ignorando outras, também importantes, relativas à protecção integrada e a outros temas. A AFN obteve o consenso de **28** entidades, mas só se conhecem os pareceres de **6** entidades (bem esclarecedores!) e textos relativos a audições de 5 Confederações de Agricultores e à audiência da ANIPLA (alguns **muito preocupantes**) (ver 3, 4, 5 e 6).
- Nas 5 **Confederações de agricultores** merecem realce:
 - a **CONFAGRI** referir **omissões da protecção integrada**, na PL 82/XII e os óbvios inconvenientes da “incompatível” mistura da transposição da Directiva com a revisão do Decreto-Lei 173/2005;
 - a **AJAP** frisar a dramática degradação das importantes actividades de **FORMAÇÃO e ASSISTÊNCIA TÉCNICA** em protecção integrada! (ver 5).
- Perante o **CRIVO** do Processo de reavaliação dos pesticidas, que, até 13/3/09, reduziu em **74%** o nº de s.a, em 15/7/93, na UE, há quem argumente, a par da AFN, que outro **CRIVO**, a **protecção integrada**, está a impedir a COMPETIVIDADE da Agricultura portuguesa.
Escasseia a informação, fundamentada em inquéritos, relativa a outras culturas, além da vinha, o que não impede os frequentes “**alarmes**” dos “**arautos da Desgraça**”. E o **CRIVO**, da protecção integrada, na vinha, não impediu:
 - o aumento de s.a. **homologadas** de **24%**, entre 1989 e 1997 e de **3%**, entre 1997 e 2012;
 - o aumento de s.a. **autorizadas** em **protecção integrada** de **32%**, entre 1997 e 2012.
 - a redução no nº de s.a. proibidas em **protecção integrada** de: **63%**; entre, 1997 e 2012 e de **25%** entre 2005 e 2012, (ver 7)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – AJAP (2012) – *Posição da AJAP. Proposta de Lei nº 82/XII*, 4 p.
- 2 – AMARO, P. Coord. (2001) – *Simpósio A prática da protecção e produção integradas da vinha em Portugal*, Lisboa, 228 p.
- 3 – AMARO, P. (2005) – *As organizações de agricultores de protecção integrada e de produção integrada (1994-2004)*. ISA/Press, Lisboa, 124 p.
- 4 – AMARO, P. (2006) – A produção integrada vai continuar a ser financiada mas é indispensável melhorar a qualidade para garantir a sustentabilidade. *Revta Jovens agricultores*, 65:10-11.
- 5 – AMARO, P. (2007) – *A política de redução dos riscos dos pesticidas em Portugal*. ISA/Press, Lisboa 167 p.
- 6 – AMARO P. (2009) - A nova legislação de pesticidas na União Europeia. *Vida Rural*, 1746:27.
- 7 – AMARO, P. (2010) – *Comentários e propostas de alteração ao Projecto de Decreto-Lei (revisão do DL 173/2005, 7 p.)*
- 8 – AMARO, P. (2012) – A classificação toxicológica dos pesticidas em 2011 em Portugal. *9º Enc. nac. Prot. Integ.*, Viseu, Nov. 11. *Revta Ciênc. agrár.* 35/2:100-117.
- 9 – AMARO, P. (2012) – As perspectivas da protecção integrada em Portugal, em 1/1/14. *Revta APH*, 108: 20-24.
- 10 – AMARO, P. (2012) – *Algumas questões sobre a transposição da Directiva nº 2009/128/CE pela Proposta de Lei 82/XII*, 10 p.
- 11 – AMARO, P. (2012) – *A falta de rigor na transposição da Directiva nº 2009/128/CE pela Proposta de Lei nº 82/XII*, 17 p.
- 12 – AMARO, P. (2012) – *Sugestão de nova Proposta de Lei para substituir a nº 82/XII*, 15 p.
- 13 – AMARO, P. (2012) – *A obsessão da Autoridade Fitossanitária Nacional pela BPF e o Plano de destruição da protecção integrada*, 5 p.
- 14 – AMARO, P. (2013) – *A protecção integrada nas audições e na audiência sobre a Proposta de Lei 82/XII*. 9 p.
- 15 – AMARO, P. (2013) – Que futuro para a protecção integrada em Portugal? *Agrotec*, 6: 93-96.
- 16 – AMARO, P. (2013) – Os contrastes da evolução, em 36 anos, da protecção integrada em Portugal. *Revista APH* (pub.)
- 17 – AMARO, P. (2013) - A evolução dos pesticida e da área em protecção integrada da vinha em Portugal. *9º Simp. Vitivin. Alentejo, Évora* (pub.).
- 18 – AMARO. P. (2013) – A selecção dos pesticidas e outras medidas são fundamentais em protecção integrada da vinha. *9º Simp. Vitivin. Alentejo, Évora* (pub.).

- 19 - ANIPLA (2012) - *Reunião Comissão de Agricultura e Mar 10 de Outubro de 2010*, 10p.
- 20- BLOCO DE ESQUERDA (2013) – Projeto de Resolução nº 663/XII/2.^a – Recomenda ao Governo a adoção de medidas para a preservação das populações de abelhas e de outros polinizadores. 3p
- 21- CAP (2012) – *Parecer: Confederação dos agricultores de Portugal. Proposta de Lei 82/XII*, 5 p.
- 22- COMISSÃO EUTROPEIA (2002) - *Para uma estratégia temática do uso sustentável dos pesticidas*, 40 p.
- 23- COMISSÃO EUROPEIA (2006) – *Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a Framework for Community action to achieve a sustainable use of pesticides(CEC 2006 zzz). 27p.)*
- 24 – CONFAGRI – (2012) – *Proposta de Lei 82 /XII. Parecer da CONFAGRI*, 4 p.
- 25- CNA (2012) - *Contributos da CNA à Proposta de Lei 82/XII*, 2p.
- 26 – CNJ (2012) – Intervenção na audição de 4/12/12.
- 27 – DECO (2012) – Parecer PARC-000263-2012 de 10/7/12
- 28 – MINISTRA DA AGRICULTURA, DO MAR, DO AMBIENTE E DO ORRDENAMENTO DO TERRITÓRIO (2012) – *Resposta à Pergunta nº 342/XII, de 25/10/12*. 3p.
- 29 – OLIVEIRA, A. B. & HENRIQUES, M. (2011) – *Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada*. DGADR, Lisboa, 221 p.

A EVOLUÇÃO DOS PESTICIDAS E DA ÁREA EM PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA EM PORTUGAL

Pedro AMARO ¹

RESUMO

O apoio de três Quadros de apoio à agricultura proporcionou, em Portugal, o desenvolvimento da prática da protecção integrada, que atingiu **62 000 ha** em **1999** e **362 100 ha** em **2012**, mas em **30/6/05**, com **238 000 ha**, era “muito decepcionante a conclusão sobre a **qualidade** da protecção integrada e da produção integrada”. Actualmente, não se conhecem dados oficiais relativos à vinha, mas em **2003**, no total de **88 059 ha**, com 78 474 ha de protecção integrada e 9585 ha de produção integrada, correspondiam à vinha as áreas de **56%** do total de PI e **70%** de PRODI. É fundamental que as entidades oficiais esclareçam a dimensão das áreas da vinha nos **362 100 ha** de protecção integrada em **2012**. Procurou-se conhecer a actual: disponibilidade de **pesticidas**; e importância dos **inimigos na vinha**. Um **inquérito a organizações de agricultores**, cooperativas e organismos de **certificação** proporcionou dados sobre técnicos, agricultores e áreas de vinha em protecção integrada ou PRODI. A área de vinha corresponderá a cerca de **11%** da área oficial relativa ao total de protecção integrada (PI+PRODI) = **362 100 ha**.

Palavras-chave: Agricultor, apoio técnico, autorizado, certificação, homologado, inimigo, proibido

1 - A EVOLUÇÃO DOS PESTICIDAS ENTRE 1991 E 2011 EM PORTUGAL

1.1 - O aumento do consumo de pesticidas, em 1990-2002, a situação ímpar de Portugal na UE e na OCDE e o predomínio do consumo na vinha

O consumo de pesticidas em Portugal foi de **6117 t** em 1992 e **7736 t**, em 1991-1992, aumentando até **17 451 t** em 2002, ou seja **126 %**, de 91/92 e, depois, com redução até **15 703 t (>103 %)**, em 2006, e posterior aumento, em 2008, **17 060 t (>121 %)**. Nova redução ocorreu, desde 2009, com valores similares, em 2009 (13 985 t), 2010 (13 795 t) e 2011 (**14 002 t**), ou seja **>81 %** do que em 1991/92 (Figura 1) (7).

¹ Instituto Superior de Agronomia (UTL), Tapada da Ajuda, Lisboa. pedroamaro@netcabo.pt

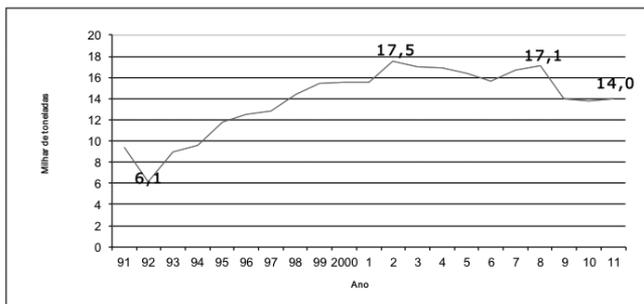


Figura 1 – Evolução das vendas, em toneladas de s.a. de pesticidas, entre 1991-92 e 2011, em Portugal (6,7)

É bem evidente o progressivo acréscimo do consumo de pesticidas, na década de 90, de **126%**, com o máximo de **17 451 t**, em 2002. Nos 10 anos seguintes, verificou-se a estabilização de 17 031 t, em 2003 e **17 060 t** em 2008 e o mínimo de 15 702 t em 2006 com a redução de 18% entre 2008 e as **13 985 t** de 2009. Depois, surge tendência de estabilização até 2011 com 13 795 t em 2010 e **14 002 t** em 2011 (Figura 1) (5,7).

O aumento da média anual, entre 1991-2001, com **11 985 t** e 2002-2011, com **15 3901 t** foi de **33%**. Este aumento muito significativo coincide com a posição ímpar e muito destacada de Portugal, no conjunto de **27** países da **OCDE**, entre 1990-92 e 2000-02. **Portugal** surge isolado com o **aumento de 100%**, no consumo de pesticidas, após **Turquia, Polónia e Grécia (40%)** e **Itália, Espanha, México e EUA (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**) (Figura 2) (6,10).

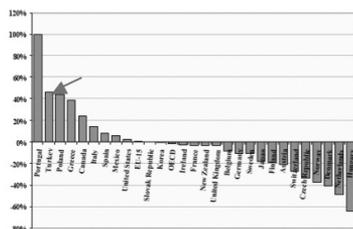


Figura 2 – Aumento ou redução do consumo de pesticidas, em percentagem, entre 1990-92 e 2000-02, em 27 países da OCDE (6,10)

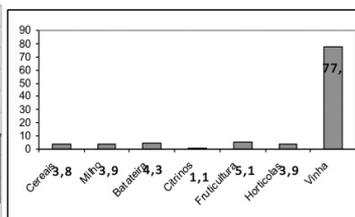


Figura 3 – Consumo de pesticidas, médio (1992 - 2003), expresso em percentagem do total anual, em 7 culturas. EUROSTAT (7,12)

Em Portugal, tem **predominado o consumo de pesticidas, na cultura da vinha** com valores, em média entre 1992 e 2003, de **77,4%** dos pesticidas (67,8%, em 1998 e 83.2% em 2002), em grande parte para combater o míldio e o oídio. Outras culturas consomem: entre 1,1% em citrinos e 5,1% em fruteiras (Figura 3) (7,12).

1.2 - A evolução dos insecticidas, fungicidas e herbicidas em Portugal

O **consumo** de pesticidas, em **toneladas**, em **2011**, foi: **71,2%** de **fungicidas** (48% enxofre); **14,2%** de **herbicidas**; e **2,4 %** de **insecticidas e acaricidas** (11).

O total de substâncias activas (s.a.) Simples, em 2011, é **242** (e não 222, como se refere em (13)). Os 3 grupos de pesticidas com maior nº de s. a. **Simples + Misturas**, em 2011, são os **fungicidas** (**115** s.a.), os **herbicidas** (**102** s.a.) e os **insecticidas** (**62** s.a.). Depois, surgem 5 nematodocidas, 2 moluscicidas, 2 rodenticidas, 12 reguladores de crescimento, a difenilamina para condicionamento fisiológico das culturas, 10 adjuvantes, 2 algicidas, 1 repulsivo e 4 feromonas sexuais, no total de **318** s.a. (8).

A evolução do número de s.a. Simples dos 3 grupos mais importantes de pesticidas, entre **1970 e 2011**, evidencia o **total máximo (292)** em **2002**, seguido de **279**, em **2011**, e com o **mínimo (139)** em **1970**. Os **valores mais elevados** ocorrem: em **2011**, para **fungicidas** (**115** ou **41%**) e **herbicidas** (**102** ou **37%**); e, em 2002, para **insecticidas** (**84** ou **29%**) (Quadro 1, Figura 4) (8).

Quadro 1 – Evolução do número e percentagem de insecticidas, fungicidas e herbicidas, entre 1970 e 2011, em Portugal (8)

Pesticida	1970		1980		1991		2002		2005		2011	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Insecticida	65	46	69	74	30	84	73	62	22			
Fungicida	37	27	50	96	39	113	101	115	41			
Herbicida	37	27	63	78	31	95	87	102	37			
TOTAL	139		180	248		292	261	279				

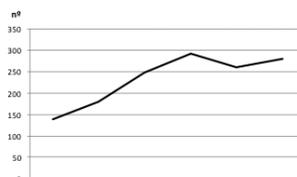


Figura 4 – Evolução do número de insecticidas, fungicidas e herbicidas (8)

A evolução, entre 1970 e 2011, destes pesticidas, em número de s.a. e em percentagem, evidencia tendência crescente mais nítida dos fungicidas e depois dos herbicidas e impasse no número (65-84-62) e clara redução na percentagem (46-30-22%) dos insecticidas (Figura 5, Quadro 1) (8).

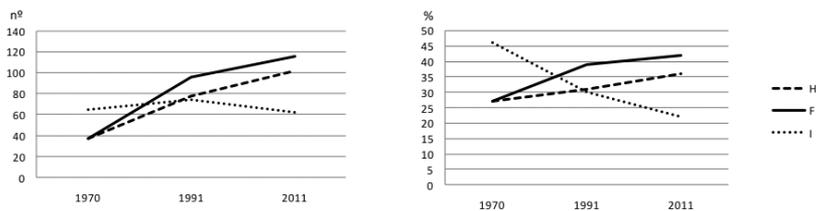


Figura 5 – Evolução do nº e % de insecticidas (I), fungicidas (F) e herbicidas (H), entre 1970 e 2011 (8)

2 – OS INIMIGOS DA VINHA E OS PESTICIDAS PARA O SEU COMBATE

2.1- A importância relativa dos inimigos da vinha

O nº de tratamentos, em 194 vinhas, em 9 regiões de Portugal Continental, entre 1995 e 1999, evidenciou a presença de 14 inimigos, sendo 8 pragas, 5 doenças e 1 o conjunto das infestantes. O oídio com 42,5% e o míldio com 36,4% dos tratamentos são os 2 principais inimigos-chave da vinha, além de 3 inimigos-chave com menos importância: podridão-cinzenta – 6,5%; traça – 6,0%; e infestantes – 4,9%. Entre os 9 inimigos ocasionais destacam-se a escoriose com 1,6% e a cigarrinha-verde com 1,0% e, depois, com 0,3% - áltica, cochonilha-algodão e caracóis, com 0,1% - ácaros e com 0,04% - esca, afídeos e casaca-de-ferro (2) (Figura 6).

Recentemente, surgiram, com preocupante importância, 2 doenças: a flavescência dourada causada por um fitoplasma transmitido pelo insecto cicadélido *Scaphoideus titanus*, há muito uma praga exigindo tratamentos em França e outros países; e a podridão-negra, incluída nas “outras podridões”, antes, com escassa importância (3).

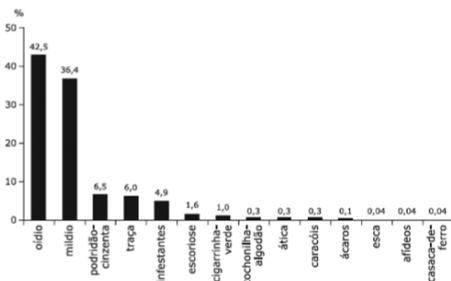


Figura 6 – Tratamentos, expressos em percentagem, efectuados em 194 vinhas para combater 14 inimigos, entre 1995 e 1999 (2)

2.2 – Os pesticidas homologados, autorizados ou proibidos em protecção integrada da vinha

A reavaliação dos pesticidas agrícolas, objectivo da Directiva 91/414/CEE, e a consequente proibição de numerosas substâncias activas (s.a.) **não** impediram, em Portugal, o **aumento** do;

- total de s.a. homologadas na vinha, de **24%**, entre 1989 e 1997 e **3%**, de 1997 a 2012;
- total de s.a. autorizadas em protecção integrada, entre 1997 e 2012, de **32%**,

A eliminação de s.a. com risco inaceitável para a saúde e o ambiente e a sua substituição por novas s.a. viabilizaram a grande **redução de 63%** do nº de s.a. **proibidas** em protecção integrada da vinha, de 40 em 1997 para 15 em 2012 (Quadro 2, Figura 7).

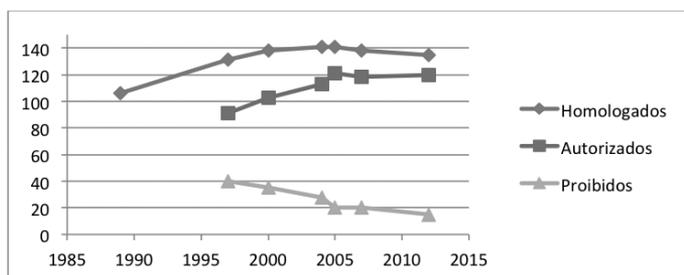


Figura 7 – Evolução do nº de s.a. homologadas e autorizadas ou proibidas em protecção integrada da vinha
Quadro 2 – Evolução do nº de s.a. homologadas e autorizadas ou proibidas em protecção integrada da vinha, entre 1989 e 2012

Ano	Homologadas	Autorizadas	Proibidas
1989	106		
1997	131	91	40
2000	138	103	35
2004	141	113	28
2005	141	121	20
2007	138	118	20
2012	135	120	15

Informação proveniente da Estação de Avisos do Douro, relativa a pesticidas disponíveis, em 2012, para combater os 5 inimigos-chave e 21 inimigos ocasionais da vinha, é resumida no Quadro 3.

Quadro 3 – Número de substâncias activas (s.a) homologadas e autorizadas, ou proibidas em protecção integrada para combater inimigos-chave e ocasionais da vinha, em 2012

Inimigo da vinha	s.a.	s.a. em protecção	
	n.º	autorizada	proibida
Inimigo-chave			
míldio	48	47	1
oidio	25	23	2
podridão-cinzenta	12	12	0
traça	18	10	8
infestantes	23	18	5
Total	126	110	16
		87%	13%
Inimigo ocasional			
<i>Botryosphaeria sp</i>	1	1	0
esca	0	0	0
escoriose	11	11	0
eutipiose	0	0	0
ácaros	2	2	0
ácaros eriofídeos	1	1	0
áltica	3	3	0
aranhão-vermelho e outros tetraniquídeos	3	3	0
caracóis e lesmas	2	1	1
charuteiro	0	0	0
cicadélídeos	0	0	0
cigarrinha-verde	12	5	7
cochonilhas	2	2	0
cochonilha-algodão	2	2	0
coleópteros curculionídeos	1	1	0
erinose	3	3	0
formas hibernantes de insectos e ácaros	1	1	0
gorgulhos	0	0	0
mosca-do-Mediterrâneo	2	2	0
nóctuas	0	0	0
pirale	3	3	0
<i>Scaphoideus titanus</i>	2	2	0
térmitas	0	0	0
Total	51	43	8
		84%	16%
Total	177	153	24
		86%	14%

Nos **5 inimigos-chave**, a disponibilidade de s.a. varia de 48 homologadas para o míldio a 12 para podridão cinzenta, com 25 no oídio, 23 nas infestantes e 18 na traça e, em protecção integrada da vinha, são autorizadas 87% e proibidas 13%. Em **16 inimigos ocasionais** 84% são autorizadas e 16% proibidas em protecção integrada; as s.a. homolo-

gadas variam entre 12 (cigarrinha-verde), 11 (escoriose) e 1 (ácaros eriofídeos, *Botryosphaeria sp.*, curculionídeos e formas hibernantes de insectos e ácaros).

No total dos **21** inimigos da vinha, em **2012**, em protecção integrada, estão autorizadas 86% e proibidas 14% das s.a.(Quadro 3), valores mais favoráveis do que os de **2005**, relativos a 25 inimigos, com **26%** proibidas e **74%** autorizadas (5).

3 – O APOIO TÉCNICO DAS ORGANIZAÇÕES DE AGRICULTORES À PRÁTICA DA PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA PELOS VITICULTORES

Através de inquérito a **37** organizações de agricultores, com dados de protecção integrada da vinha de 2004, divulgados, em 2005, nos Quadros 12 e 16 de (4), procurou-se esclarecer, relativamente a **2012**, o nº de técnicos e de viticultores e a área (ha) de vinha em protecção integrada. Esta actividade foi interrompida em 5 entidades (AARA, APAMIM, As. Agr. Ribatejo, As. Agr. Ribeira Teja e Vale do Côa e UNIROCHA) (Quadro 5). Das restantes **32** entidades, em 2004, **13** deram apoio técnico só na cultura da vinha e **19**, além da vinha, em 1 a 7 culturas (Quadros 4 e 5).

No conjunto destas **32** organizações de agricultores, o apoio técnico em protecção integrada da vinha ocorreu, em **2012**, por **121** técnicos em **36 986 ha**, de **3834** agricultores. As reduções relativas a 2004, isto é em 8 anos, foram de **77%** no nº de agricultores e de **55%** no dos técnicos (4).

Quadro 4 – Apoio técnico, em protecção integrada da vinha, em 2012, em 21 427 ha a 1371 viticultores por 39 técnicos de 13 organizações de agricultores, com actividade exclusiva na vinha, em 2004 (4)

Organização de Agricultores	Viticultor (nº)		Técnico (nº)		Área (ha)
	2004	2012	2004	2012	
ADIVAT	40	40	2	1	400
ADVID	168	129	7	6	5371
AGRESTA	104	11	2	1	45
AGROTEJO	32	2	1	1	80
APIBAIRRADA	50	25	2	1	460
APUVE	36	35	2	1	500
ATEVA	1166	850	23	12	9800
AVA ALENQUER	184	16	5	1	379
AVIPE	120	150	5	5	2761
CAVES FELGUEIRAS	57	20	3	2	130
CAVES SANTA MARTA	486	17	5	2	138
CENTRO GESTÃO E.A. REGIÃO DOURO SUL	218	63	5	4	906
VITI CARTAXO	127	13	4	2	457
TOTAL	2788	1371	66	39	21427

Quadro 5 – Apoio técnico, em protecção integrada da vinha, em 2012, em 15 559 ha, a 2463 agricultores por 82 técnicos de 19 organizações de agricultores com actividade, além da vinha, noutras 1 a 7 culturas, em 2004 (4)

Organização de Agricultores	Agricultor (nº)		Técnico (nº)		Área (ha)		Cultura (nº)
	2004	2012	2004	2012	2012	2004	
AANT	835	234	12	7	1647	5	
APIM	589	300	13	7	2800	4	
AARA	98	0	3	0	0	3	
AATM	3100	800	25	18	4250	6	
AATV	180	16	5	2	247	3	
AAVV	41	33	1	1	120	2	
AFBT	225	27	4	2	122	2	
AFUVOPA	550	118	7	3	621	3	
AJAP	3800	222	50	10	2202	5	
APAMIM	147	0	4	0	0	2	
APAS	470	58	12	7	950	4	
APIDÃO	218	60	5	2	448	2	
APIZÉZERE	294	51	10	4	280	4	
APITAD	1570	61	9	4	235	3	
AS.AGR.RIBATEJO	79	0	4	0	0	5	
AS.AGR. RIBEIRA TEJA E VALE DO CÔA	318	0	5	0	0	4	
AS.AGR. VALE DA VILARIÇA	175	20	3	2	50	2	
AVAPI	600	13	14	4	67	8	
AVITILIMA	166	97	5	3	648	2	
AVITRA	15	1	1	1	50	3	
CENTRO GESTÃO E.A. ÔBIDOS	25	2	2	1	81	3	
CENTRO GESTÃO E.A. VALE DA PORCA	202	150	3	2	655	2	
RESDOURO	105	200	2	2	86	2	
UNIROCHA	79	0	5	0	0	4	
TOTAL	13 881	2463	204	82	15 559	83	

Em 2004 havia **43 cooperativas**, com **96** técnicos que asseguravam apoio, em protecção integrada, a **3432** agricultores em 1 a 4 culturas. O apoio à vinha ocorreu em **26** cooperativas, com 18 só à vinha. A protecção integrada da vinha abrangeu **2517 agricultores** com o apoio de **61 técnicos** (4).

Segundo a CONFAGRI, em 2012, só 7 cooperativas transmitiram dados, com 5 sem actividade de protecção integrada da vinha, portanto, só limitada a 2 (Adega Favaio e COOPQUER), com 7 técnicos, **1335 ha** de vinha e **365** agricultores. Que diferença para 2004, confirmada pela percepção transmitida de “ que hoje, serão muito poucas as Adegas que apoiam os viticultores nas áreas da protecção integrada e da produção integrada”!

A área de protecção integrada da vinha referida, para 2012, nos Quadros 4 e 5 e para cooperativas, é de **38 341 ha**, correspondente a **10,6 %** da área oficial = **362 100 ha**. É surpreendente perante os dados de 2003: protecção integrada - **56%**, PRODI – 70% (4)

4 – OS ORGANISMOS DE CONTROLO E CERTIFICAÇÃO

O Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território divulgou, em

Dezembro de 2012, a lista dos 8 Organismos de Controlo e Certificação. Só 5 tiveram intervenção em protecção integrada da vinha em 2012. A actividade de **42** técnicos abrangeu **41 387 ha** de vinha de **4024** agricultores (Quadro 6). Esta área com certificação corresponde a **11,4 %** da referida área oficial de 361 100 ha. A média de **11,4** e **10,6** é

Quadro 6 - A actividade, em 2012, de 8 organismos de controlo e certificação em protecção integrada da vinha

Organismo de Controlo e Certificação	Técnico (nº)	Agricultor (nº)	Área (ha)
AGRICERT	3	17	250
APCER	0	0	0
CERTIS	8	1220	10 665
CODIMACO	8	469	5490
NATURALFA	0	0	0
SATIVA	20	1424	18 710
SGS Portugal	0	0	0
TRADIÇÃO E QUALIDADE	3	894	6272
TOTAL	42	4024	41 387

de **11%**, muito inferior a **56%** de PI e **70%** de PRODI na vinha, em 2003. **Que declínio!**

5 - CONCLUSÕES

- O **aumento do consumo de pesticidas**, em Portugal, na década de 90, foi o **mais elevado (126%)** na UE e, desde 1999 até 2011, variou de 14 000 t a 17 500 t (Figuras 1 e 2).
- O **consumo de pesticidas na vinha**, em volume, é **superior a 50%** do total das culturas e atingiu **77,4%**, em média, entre 1992 e 2003 (Figura 3).
- O **nº de s.a.** (fungicidas, herbicidas e insecticidas) aumentou sempre, desde 1970 (139) até 2002 (292) e, depois, com redução até 261 em 2005 e aumento até 2011 (**279**) (Quadro 1, Figuras 4 e 5).
- No combate a **5 inimigos-chave** e **16 inimigos ocasionais da vinha** predominou o uso de **fungicidas**, em especial no combate ao míldio e ao oídio (Figura 6), com o maior nº de s.a., respectivamente, 48 e 25 homologadas, em 2012 (Quadro 3).
- Entre 1997 e 2012, o **aumento** do nº de s.a. **homologadas** em vinha, foi de **3%**, a par de **32%** nas **autorizadas** em protecção integrada; e nas **proibidas** em protecção integrada ocorreu a **redução** de **63%** (Quadro 2, Figura 7).

- Em 2012, 121 técnicos de 32 organizações de agricultores deram apoio a 2984 agricultores em 36 986 ha de vinha, em protecção integrada, com predomínio de PRODI; relativamente a 2004, a **redução** foi de 77% no nº de agricultores e de 55% no de técnicos, evidenciando o **grave declínio da protecção integrada** (Quadros 4 e 5).
- Em 2012, 5 organismos de controlo e certificação, com 42 técnicos, asseguraram a **certificação** em protecção integrada de 41 387 ha de vinha a 4024 agricultores (Quadro 6).
- Os valores da **área de protecção integrada da vinha** relativos ao apoio técnico de organizações de agricultores ou à intervenção dos organismos de certificação correspondem a cerca de 11% (10,6 -11,4) da área oficial de protecção integrada em 2012, o que surpreende pela posição cimeira da vinha em 2003 (56% de PI, 70% de PRODI). Outra esclarecedora evidência do **profundo declínio da protecção integrada**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – AMARO, P. Coord. (2001) – *Simpósio A prática da protecção e produção integradas da vinha em Portugal*, Lisboa, 228 p.
- 2 – AMARO, P. (2003) - *A protecção integrada*. ISA/Press, Lisboa, 446 p.
- 3 – AMARO, P. Ed. (2004) – *A protecção integrada da vinha na Região Norte*. ISA/Press, Lisboa, 2ª Ed., 148p.
- 4 - AMARO, P. (2005) – *As organizações de agricultores de protecção integrada e de produção integrada (1994-2004)*. ISA/Press, Lisboa, 124 p.
- 5 - AMARO, P. (2007) – O uso sustentável dos pesticidas optimiza a luta contra os inimigos da vinha. 7.º *Simp. Vitivin. Alentejo, Évora, Maio 07*, 1: 94-106.
- 6 - AMARO, P. (2009) - A evolução do consumo de pesticidas em Portugal e na União Europeia. *Espaço Rural*, 71:13-17.
- 7 – AMARO, P. (2010) - O enxofre é o pesticida com maior consumo em Portugal na vinha. 8º *Simp. Vitivin. Alentejo, Évora, Maio 10*: 221-231.
- 8 – AMARO, P. (2012) – A classificação toxicológica dos pesticidas em 2011 em Portugal. 9º *Enc. nac. Prot. Integ.*, Viseu, Nov. 11. *Revta Ciênc. agrár.* 35/2:100-117.
- 9 – AMARO, P. (2013) – Que futuro para a protecção integrada em Portugal. *Agrotec*, Março 13:93-96.
- 10 – HERBKE, N., DWORAK, T. & KARACZUN, Z. M. (2006). *WFD and Agriculture – Analysis of the pressures and impacts. Interim report – 18/10/06*. 41p.
- 11 – LEITÃO, A. & ABREU, J.V. (2012) - *Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2011*, 1-25. DGAV.
- 12 – NADIN, P. (2007) – *The use of plant protection products in the European Union. Data, 1992-2003*. EUROSTAT.
- 13 – OLIVEIRA, A. B. & HENRIQUES, M. (2011) – *Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada*. DGADR, Lisboa, 221 p.

A SELECÇÃO DOS PESTICIDAS E OUTRAS MEDIDAS SÃO FUNDAMENTAIS EM PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA

Pedro AMARO¹

RESUMO

A prática adequada dos Princípios gerais da protecção integrada, definidos na Directiva do uso sustentável dos pesticidas, poderia proporcionar a tão importante e indispensável **melhoria da qualidade da protecção integrada da vinha, em Portugal**, o que deveria ser desejável pelas organizações de agricultores, entidades oficiais e indústria dos pesticidas e **se respeitadas as orientações da Directiva**, em especial em sua rigorosa **transposição**. É fundamental fomentar condições desfavoráveis aos inimigos das culturas, reduzir o uso de pesticidas, proceder a tratamentos só quando indispensável e os técnicos, os agricultores e os aplicadores conhecerem as características toxicológicas e ecotoxicológicas e as medidas de segurança dos pesticidas autorizados, para acautelar os riscos e viabilizar **a seleção dos pesticidas menos tóxicos para a saúde humana e animal e para o ambiente** (em especial, os organismos não visados, como auxiliares, abelhas, organismos aquáticos, aves e organismos do solo), além de evitar ou reduzir o risco de resistência aos pesticidas dos inimigos das culturas, política ignorada, a nível oficial em Portugal, desde **2005**.

Palavras-chave: AFN, BPF, Directiva, eliminação, omissão, PL82/XII, transposição

1- OS 8 PRINCÍPIOS GERAIS DE PROTECÇÃO INTEGRADA

Como é do conhecimento geral, o **conceito de protecção integrada** surgiu, há **54** anos, em **1959**, na Califórnia, por iniciativa de investigadores muito preocupados com questões ecológicas e económicas, ampliadas a preocupações toxicológicas, em **1977**, na **Declaração de Ovronnaz**, da OILB/SROP. Nas 3 edições das **Regras de produção integrada** da OILB/SROP, de **1992**, **1999** e **2004**, as preocupações foram ampliadas a sociológicas, a infraestruturas ecológicas, à **ênfase na restrição no uso dos pesticidas** e a questões de auto-avaliação, inspecção, certificação, qualidade, segurança alimentar e rastreabili-

¹ Instituto Superior de Agronomia (UTL), Tapada da Ajuda, Lisboa. pedroamaro@netcabo.pt

dade (6 p. 27) . Na **Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, no seu Objecto (art. 1º), **promove-se o recurso à protecção integrada**, definida no art. 3º.6, referindo-se, no **art. 14º**, as **Medidas para assegurar a sua prática** e no **Anexo 3** os **Princípios Gerais da protecção integrada**.

Os **8 Princípios Gerais** da prática da protecção integrada, abrangem:

- **1º** - Proceder a 6 tipos de **Medidas indirectas** para prevenção ou combate de organismos nocivos, nomeadamente, por:
 - rotação de culturas;
 - técnicas culturais, como a sementeira directa, o enrelvamento ou a poda;
 - cultivares resistentes/tolerantes;
 - práticas equilibradas de fertilização, de calagem e de irrigação/drenagem;
 - medidas de higiene, como limpeza do equipamento e de máquinas;
 - e protecção de organismos úteis importantes, através de infraestruturas ecológicas.
- **2º** - **Recurso a métodos e instrumentos** que viabilizem a **estimativa do risco**, como observações no terreno, sistemas de alerta, de aviso e de diagnóstico precoce, apoiados por informações de conselheiros qualificados profissionalmente.
- **3º** - **Decisão de tratamento** baseada em **níveis económicos de ataque**, ou **modelos**.
- **4º** - **Preferência**, se possível, às lutas biológica, biotécnica e física perante a luta química.
- **5º** - **Preferência**, quando possível, por pesticidas selectivos e com o mínimo de efeitos secundários relativamente à saúde humana e animal e ao ambiente (em especial, os organismos não visados como auxiliares, abelhas, organismos aquáticos, aves e organismos do solo).
- **6º** - **Redução ao mínimo indispensável de pesticidas**, quanto a doses, frequência de tratamentos e a opção por tratamentos parciais, assegurando o nível de prejuízos aceitável e o não aumento do risco de resistência dos organismos nocivos.
- **7º** - **Adopção de estratégias de anti-resistência** para manter a eficácia dos pesticidas, recorrendo, nomeadamente, a pesticidas com diferentes modos de acção.

- **8º - Verificação e registo do êxito** das medidas fitossanitárias adoptadas.

Estes 8 Princípios Gerais asseguram **4 Características específicas da protecção integrada**:

I – Estimular o desenvolvimento de condições desfavoráveis aos inimigos das culturas, através de Medidas Indirectas.

II – Bases de decisão de intervenção com pesticidas (ex: estimativa do risco por observação da cultura, sistema de Avisos e diagnóstico precoce; níveis económicos de ataque e modelos).

III – Intervenções:

- Doses e frequência de tratamento mínimas;

- **Seleção:**

(1) – preferência por lutas biológica, biotécnica, física e outras em relação à luta química;

(2) – preferência por pesticidas selectivos e com os **mais reduzidos efeitos secundários** para a **saúde humana e animal e o ambiente** (em especial, os organismos não visados);

(3) – de pesticidas, segundo estratégias anti-resistência dos inimigos das culturas.

IV – Verificação do êxito da protecção integrada da cultura.

2- A BOA PRÁTICA FITOSSANITÁRIA É MUITO DIFERENTE DA PROTECÇÃO INTEGRADA

A **boa prática fitossanitária (BPF)** teve origem, em **1987**, no Grupo de Trabalho de Pesticidas da OEPP, mas só em **1994** surgiu a norma da boa prática fitossanitária e **24 normas** até **2003**, ano da revisão do conceito inicial (3 p. 325,332). A actual definição, adoptada no Regulamento 1107/2009, da colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado, refere que os pesticidas “são seleccionados, doseados e distribuídos no tempo para assegurar uma eficácia aceitável com a quantidade mínima necessária, tendo devidamente em conta as condições locais e as possibilidades de luta biológica”. De facto,

a BPF tem só 2 **objectivos**: ser **eficaz** (matar o inimigo da cultura) e evitar a **resistência** dos inimigos das culturas ao pesticida (3 p.325-328), tão do agrado da Indústria dos pesticidas (6 p. 122).

Em Novembro de 2011, Miriam Cavaco, da **Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN)**, descobriu e divulgou que a **BPF ignora 6 das 7 exigências da protecção integrada** (17), e que **se limita** à “observação do nível de infestação dos inimigos das culturas”. Já há 15 anos, Pedro Amaro, no 4º Encontro Nacional de Protecção Integrada, nos Açores, esclareceu que a BPF não parece ser aceitável em agricultura sustentável (1, 3 p.325,332). As **profundas diferenças** entre os 2 conceitos, são esclarecidas em 16 textos divulgados entre 1997 e 2003 (3 p.332-333) e em 2007 (6 p. 41-44) (13 p.3).

3 – A PROTECÇÃO INTEGRADA DA VINHA, COM QUALIDADE, EM PORTUGAL, TEM SIDO IMPEDIDA A NÍVEL OFICIAL

3.1 - A evolução da protecção integrada em Portugal (8)

O **ensino da protecção integrada** teve início no ISA, na disciplina de Fitofarmacologia, em 1977.

O **desenvolvimento da prática da protecção integrada** ocorreu, em Portugal, nos últimos **30 anos**, estimulado por numerosas iniciativas de que se destacam:

- o **Curso FAO/DGPPA de Protecção Integrada**, de 1980-81;
- o **Mestrado de Protecção Integrada**, de 1989 a 2000, com 96 alunos e 65 dissertações;
- as várias **Disciplinas de Protecção Integrada**, em cursos de Universidades e Escolas Superiores Agrárias, de 1986 (ISA) a 2013;
- os **8 livros** sobre **Protecção Integrada**, de 1982 a 2008;
- os **9 Encontros Nacionais de Protecção Integrada**, entre 1991 e 2011;
- as **Regras oficiais de Protecção Integrada e Produção Integrada**, de 1997 a 2011;
- a **Assembleia Geral da OILB/SROP** em 1993 e o **Simpósio Internacional de Protecção Integrada da Vinha** em 1988, iniciativa da OILB/SROP, CNPPA e CEE (8).

A **prioridade à protecção integrada**, pelas **Medidas Agro-Ambientais**, entre 1994 e 2005, permitiu a actividade de 443 técnicos e 112 organizações de agricultores no

apoio a **22 000 agricultores, em 220 000 ha** de várias culturas, através de **250 milhões de € (8)**.

O optimismo que prevalecia, em **2006**, quanto à continuidade do financiamento da produção integrada, no período 2007-2013, com a melhoria da sua “qualidade para garantir a sustentabilidade” (4), não foi confirmado. Infelizmente, nos **últimos 6 anos**, agravou-se o **bloqueio da protecção integrada**, nomeadamente, sem informação oficial sobre a evolução, desde 2007, **da prática da protecção integrada (8)**, só esclarecida expressamente pela Ministra da Agricultura, em **2012: 362 100 ha**, mas sem informação oficial relativa a técnicos, agricultores, organizações de agricultores e áreas de vinha e de outras culturas **(18)**.

3.2 – As “resistências” à protecção integrada com reflexos na defesa da saúde e do ambiente

Perante as perspectivas da Directiva do uso sustentável dos pesticidas, já analisadas há **5 anos**, em Maio de **2007**, no 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, numa comunicação **(5)**, em que se evidenciaram as favoráveis possibilidades de desenvolvimento da protecção integrada com **qualidade**, muito se agravaram as conhecidas “**resistências**” à **protecção integrada**, em Portugal.

Em Dezembro de 2007, foi publicado o livro **(6 p.37-45)**, onde as “resistências” são analisadas em 8 página, sobre temas, como: erros da legislação; não inclusão da protecção integrada nos rótulos; deficiente defesa dos auxiliares; escasso apoio dos Serviços de Avisos, obsessão pela BPF e atraso na revisão das regras da protecção integrada.

Na sequência do **Decreto-Lei 173/2005** do uso e outras questões dos produtos fitofarmacêuticos, publicado em **21/10/05** (após **40 anos** de tentativas frustradas **(2)**), mas que **ignora a protecção integrada**, privilegiando **exclusivamente** a BPF, o **CÚMULO da “resistência”** vai surgir, em **5/7/12**, na **transposição da Directiva** do uso sustentável dos pesticidas, pela **Proposta de Lei 82/XII**.

3.3 – O Plano da Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN) de destruição da protecção integrada

A análise, ao longo de 6 meses, da **Proposta de Lei 82/XII** que procede à **transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, em debate na Assembleia da República, desde **5/7/12**, proporcionou, progressivamente, em 12 documentos (8 (9-16) referidos nesta comunicação), a **evidência de 5 Fases do PLANO da AFN de destruição da protecção integrada** (Figura 1):

I – desde **1999**, com a **Mentira da BPF=Melhores práticas** de protecção das plantas;

II - de **2002 a 2011**, com a **FORMAÇÃO** quasi só **limitada à BPF**;

III - desde **2005 até 1/1/14** (art. 16º.1a e 16º.1d da Proposta de Lei 82/XII), com a **TOMADA DE DECISÃO** e a **APLICAÇÃO** de produtos fitofarmacêuticos **limitadas à BPF**;

IV - desde **2007** até **23/11/12**, a “**esconder**” a **ÁREA** de **protecção integrada**;

V - em 5 de Julho de **2012**, a **Proposta de Lei 82/XII elimina praticamente a protecção integrada**, na **transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas**.

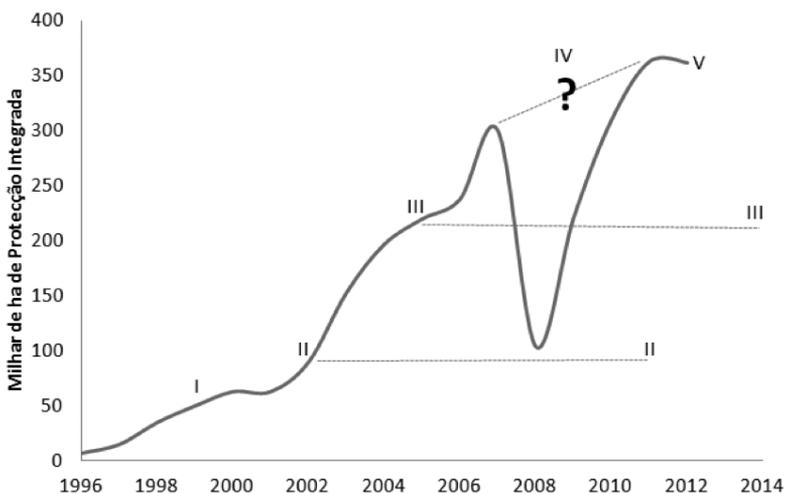


Figura 1 – O Plano da AFN de destruição da protecção integrada (12,13,14)

4 – A PROTECÇÃO INTEGRADA FOI QUÁSI ELIMINADA NA INICIAL TRANSPOSIÇÃO DA DIRECTIVA DO USO SUSTENTÁVEL DOS PESTICIDAS

A **Proposta de Lei 82/XII** elaborada pela AFN, com o consenso de **29 entidades**, que procede à **transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, foi enviada pelo Governo à Assembleia da República, em **5/7/12**, e aprovada, na generalidade, em 13/7/12. Após debate na especialidade, foi aprovada, em votação final global do texto final, na Comissão de Agricultura e Mar, em **15/2/13**, ocorrendo, em **8/3/13**, a publicação do **Decreto 126/XII**, enviado para promulgação em **14/3/13**.

A **Directiva do uso sustentável dos pesticidas** tem o **Objectivo** de **fomentar a Protecção integrada**, concretizado: no **Objecto** (art. 1º); nas **Definições** (art. 3º.6); nos **Planos de acção nacionais (PAN)** (art 4º.1); nos **Indicadores de risco** (art. 16º.2c); no **Intercâmbio de informações** (art. 18º); e nos **5 temas do art. 14º - Protecção integrada** (da **maior importância**, por serem as **Medidas** que **asseguram a prática da protecção integrada**):

- (1) **Condições necessárias** (como **Informações** e **Instrumentos de monitorização** dos inimigos das culturas e para a **tomada de decisões** e **Serviços de aconselhamento**);
- (2) **Baixa utilização de pesticidas**;
- (3) **Incentivos**;
- (4) Alterações ao Anexo III – **Princípios gerais da protecção integrada**;
- (5,6) e 2 **importantes METAS**:

- **até 30/6/13** – o envio, à COMISSÃO, do **RELATÓRIO** sobre se estão reunidas as **condições necessárias** para a aplicação da **protecção integrada**;
- **até 1/1/14** – **certificar** que os **princípios gerais da protecção integrada** são **aplicados por todos** os **utilizadores profissionais** (9, 10, 12, 15).

A **Proposta de Lei 82/XII** ignora a maioria das 11 referências da **protecção integrada**, no **Objecto** e nos artigos 3º, 14º, 16º e 18º da Directiva, e **só a cita** no Anexo II e em **2 artigos (3% de 70 artigos)**:

- **art. 51º.1, sem rigor**, eliminando “a introdução” nos PAN (art. 4º.1a da Directiva);

- **art.16º.1d, deturpado**, ao eliminar a **certificação** e a **obrigatoriedade a todos os utilizadores profissionais** (art. 14º.4 da Directiva).

A PL82/XII tem, ainda, outras **17 omissões de textos** relativos a **4 temas gerais** (7 nos **Planos de Acção Nacionais**, **3** na redução do **impacto da perigosidade** dos pesticidas, **4** na redução do uso ou dos riscos da toxicidade dos pesticidas em **zonas específicas** e **3** de **informação e sensibilização**), além de **9 omissões** nas Definições (**9, 10, 12, 15**).

As **48 Omissões**, em artigos e no Preâmbulo da Directiva, abrangem cerca de **35%** do texto da **Directiva (9)**.

A BPF **nunca** é referida na Directiva, certamente pela **incapacidade de assegurar a indispensável redução dos riscos dos pesticidas**, mas é incluída na **transposição** da Directiva, em 4 referências, 2 em **exclusividade** e na Definição (art. 3º.g) (**9, 10, 13, 14**).

Após 6 meses de debate da **PL82/XII**, foram recuperados, pelos deputados, alguns artigos da Directiva, da **maior importância**, como o **objecto** (art 1º), a **definição** (art.3º.6) e **4 temas** (1.2.4.5) do eliminado **art. 14º**.

Sem **aparentes razões ideológicas**, os deputados dos partidos do Governo mantiveram-se **insensíveis** a alterações relativas:

- a eliminar a **mistura “incompatível”** da revisão do Decreto- Lei 173/2005 (**com BPF e sem PI**) com a transposição da Directiva (**com PI e sem BPF**) (**11**);
- à recuperação do “eliminado” art. 14º;
- à **persistente obsessão da BPF**, com 4 referências e até, no art. 20º.c, em **exclusividade**, apesar da **BPF** ser “proibida” na Directiva, por **deficiente defesa** dos **riscos da toxicidade dos pesticidas**, o que não impediu de estar **sempre** presente no **PLANO da AFN de destruição da protecção integrada (9, 10, 12,13,14)**;
- e à correcção de **16 omissões**, que **persistem**, relativas: **3** (art.14º.3, 14º.4b, 15º.2c) à protecção integrada; **5** (art.4º:1a,1b,1c,1d,1e) aos PAN; **5** à defesa dos riscos da toxicidade dos pesticidas (art. 2º.3, 7º.1, 7º.2), informação ao público (art. 15º.3) e zonas específicas (art. 12º); e **3** a eliminadas definições (indicador de risco, pesticida e biocida) (**10, 14,16**).

5– CONCLUSÕES

- A política da UE de desenvolvimento da protecção integrada, pela **Directiva do uso sustentável dos pesticidas**, de 21/10/09, é ignorada pela Autoridade Fitossanitária Nacional (AFN), na Proposta de Lei 82/XII de transposição da Directiva, atingindo o **CÚMULO** do seu **Plano de destruição da protecção integrada**, iniciado em 1999 (ver 3.2 e 3.3).
- A Boa Prática Fitossanitária (BPF), que ignora 6 das 7 exigências da protecção integrada, em defesa da saúde humana e animal e do ambiente, foi privilegiada, pela AFN, em detrimento da protecção integrada, desde 1999, impedindo melhorar a qualidade da prática da protecção integrada, nomeadamente a adequada **selecção dos pesticidas** e reduzindo a **qualidade da formação dos agricultores** (ver 2 e 3.3).
- A **Proposta de Lei 82/XII**, na transposição da Directiva do uso sustentável dos pesticidas, **elimina** a protecção integrada no Objecto, nas Definições e todo o art. 14º das Medidas para assegurar a sua prática, referindo só: o art. 4º.1, sem rigor; o art. 14º.4 **deturpado**; e o Anexo III. O debate na AR proporcionou a recuperação de artigos da Directiva, da maior importância, como o Objecto (art 1º), a Definição (art.3º.6) e 4 questões do eliminado art. 14º, mas persistiram graves omissões de orientações sobre a protecção integrada, os PAN, a redução dos riscos da toxicidade dos pesticidas para a saúde humana e animal e para o ambiente e mantendo referências à BPF, inaceitáveis na Directiva (ver 4)..

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – AMARO, P. (1997) – A protecção integrada, estratégia a privilegiar em agricultura sustentável . 4º Enc. nac. Prot. Integ., Angra do Heroísmo Out. 97. *Revta Ciênc. agrár.*, 22(2): 121-138.
- 2 – AMARO, P. (2002) - Há quase 40 anos que se aguarda pela legislação da aplicação de pesticidas. Até quando? *Vida Rural*, 1686: 24-26,28,30.
- 3 – AMARO, P. (2003) - *A protecção integrada*. ISA/Press, Lisboa, 446 p.
- 4 – AMARO, P. (2006) – A produção integrada vai continuar a ser financiada mas é indispensável melhorar a qualidade para garantir a sustentabilidade. *Revta Jovens agricultores*, 65:10-11.
- 5 – AMARO, P. (2007) – O uso sustentável dos pesticidas otimiza a luta contra os inimigos da vinha. *7º Simp. Vitivin. Alentejo, Évora, Maio 07*, 1: 94-106.
- 6 – AMARO, P. (2007) – *A política de redução dos riscos dos pesticidas em Portugal*. ISA/Press, Lisboa 167 p.
- 7 – AMARO, P. (2011) – Os rótulos e as fichas de dados de segurança de pesticidas tóxicos para as abelhas. *Revta Ciências agrár.*, 34/1:93-109.
- 8 – AMARO, P. (2012) – As perspectivas da protecção integrada em Portugal, em 1/1/14. *Revta APH*, 108: 20-24.
- 9 – AMARO, P. (2012) – *Algumas questões sobre a transposição da Directiva nº 2009/128/CE pela Proposta de Lei 82/XII*, 10 p.
- 10 – AMARO, P. (2012) – *A falta de rigor na transposição da Directiva nº 2009/128/CE pela Proposta de Lei nº 82/XII*, 17 p.
- 11 – AMARO, P. (2012) – *Sugestão de nova Proposta de Lei para substituir a nº 82/XII*, 15 p.
- 12 – AMARO, P. (2012) – *A obsessão da Autoridade Fitossanitária Nacional pela BPF e o Plano de destruição da protecção integrada*, 5 p.
- 13 – AMARO, P. (2012) – *Que futuro para a protecção integrada em Portugal*. 8 p.
- 14 – AMARO, P. (2012) – *O desenvolvimento da protecção integrada exige a substituição da Proposta de Lei 82/XII*. 11 p.
- 15 – AMARO, P. (2013) – *A protecção integrada nas audições e na audiência sobre a Proposta de Lei 82/XII*. 9 p.
- 16 – AMARO, P. (2013) – *Comentários à versão da revisão da PL82/XII, de 17/1/13*. 2 p.
- 17 – CAVACO, M. (2011) – Directiva quadro do uso sustentável dos produtos fitofarmacêuticos. Enquadramento das exigências na área da protecção integrada. *Workshop para formadores na área do uso sustentável dos pesticidas*. Oeiras, Nov. 2011.
- 18 – MINISTRA DA AGRICULTURA, DO MAR, DO AMBIENTE E DO ORRDENAMENTO DO TERRITÓRIO (2012) – *Resposta à Pergunta nº 342/XII, de 25/10/12*. 3p.

RESPONSE TO TYPE OF DRIP IRRIGATION, OVERGROUND AND UNDERGROUND, OF FOUR RED GRAPE VARIETIES (*Vitis vinifera* L) TRADITIONALLY GROWN IN CASTILLA Y LEON

E. BARAJAS¹; R. YUSTE; A. VICENTE; J. YUSTE

ABSTRACT

This work aims to study the productive and qualitative effects arising from the application of two types of drip irrigation: overground and underground. A trial has been conducted in Valladolid, with vines trained in a vertical trellis system and planted with 2.7 x 1.4 m distances, including four red grape varieties: Garnacha Tinta, Juan García, Prieto Picudo and Mencía, during the period 2009-2012.

The results indicate that grape production has barely shown differences neither a clear trend between irrigation treatments, although in cases of some differences, these were due primarily to the number of berries per cluster rather than to the berry weight variation. Vegetative growth has been slightly favored by the underground irrigation, except for cv. Mencía, so that the increase of pruning wood was mainly due to the greater shoot weight. The type of irrigation did not affect the sugar accumulation in generally. The acidity neither presented notable differences between treatments, but there was a trend of underground irrigation to show more frequently an acidity level somewhat higher than the overground irrigation. These results should be considered in an overall assessment of each type of irrigation including operational, economic and environmental aspects.

Keys words: acidity, cluster, pruning wood, quality, yield.

1. INTRODUCTION

The irrigation system most widely used in the vineyards of the Iberian Peninsula is the surface drip irrigation. This is mainly due to its ease of installation and maintenance simplicity. However, this type of aerial irrigation presents some disadvantages, such as direct evaporation, development of a volume of soil exploited too shallow or difficulty

¹ Unidad de Cultivos Leñosos y Hortícolas. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)

Ctra. Burgos-Portugal km. 119, 47071 Valladolid. España. E-mail: bartolen@itacyl.es

to carry out plowing between rows. The underground located drip irrigation can be regarded as an alternative to aerial, in order to remedy or alleviate some of the drawbacks cited.

The underground irrigation development came into use at about the decade of the sixties of the last century in the U.S., but until the early eighties there was no increased interest in this technique (Camp 1998). Since then, it has been used both in annual crops, mainly vegetables, as permanent.

The underground irrigation, compared to other types of irrigation, often presented in most crops several advantages, including the ability to achieve higher performance and lower water consumption (Camp 1998, Ayars *et al.* 1999, in Romero *et al.* 2006). From the following references, all included in the work of Romero *et al.* (2006), it appears that several inherent operational characteristics of such irrigation contribute to increase efficiency in the use of water, due to greater control of unwanted vegetation (Grattan *et al.* 1988), reduction of soil evaporation (Hoffman and Martin 1993), greater root density (Phene *et al.* 1991), high activity and root absorption (Martínez-Hernández *et al.* 1991), negligible deep percolation of water and soluble salts below the root zone, negligible runoff and high uniformity of application (Phene *et al.* 1993).

According to a review of deficit irrigation in fruit trees and vines, made by Ruiz-Sánchez *et al.* (2010), the underground irrigation produced greater horizontal distribution of fine roots and stimulated root growth deeper in the soil profile. Probably, this was the main reason for the increased efficiency in water use achieved. However, one of the most commonly cited disadvantages for use underground irrigation systems is the difficulty to monitor irrigation development and control uniformity of water application (Camp 1998).

Ayars *et al.* (1999) observed that the use of underground irrigation, in different rotation extensive horticultural crops, produced a significant increase in performance and efficiency in water use. After 10 years of cultivation, the irrigation system was in good condition after having applied the recommended maintenance.

Also Bidondo *et al.* (2010), comparing the underground with overground drip irrigation on tomato surface, observed a trend of underground irrigation to present higher values in all variables considered, although differences was not statistically significant, with increased use of water from the first system over the second.

A comparison of surface irrigation and subsurface irrigation in almond, showed higher water levels in the soil for underground system according to Romero *et al.* (2004, in Holzapfel *et al.* 2009). However, a job with *Vitis vinifera* cv. Shiraz showed no significant difference between surface and underground irrigation in terms of efficiency in water use (Edraki and Krstic 2005).

Given the variability of existing soil and climatic conditions and the shortage of jobs targeted specifically to study this subject in grapevines, this study aims to determine the productive and qualitative effects arising from the application of two types of localized drip irrigation, surface and underground, on four *Vitis vinifera* varieties: Garnacha Tinta, Juan Garcia, Prieto Picudo and Mencía.

2. MATERIAL AND METHODS

The experimental trial has been carried out during the period 2009-2012 in a vineyard with four red varieties: Garnacha Tinta, Juan García, Mencía and Prieto Picudo. The vineyard is located in Zamadueñas ranch, located in Valladolid. Planting was done in 2003 with vines grafted on Richter 110. The plantation was established with a row spacing of 2.7 m and a distance of 1.4 m between rows (2645 plants/ha). Training system was trellised, arranged with North-South orientation, with Royat bilateral cordon structure, with 4 spurs of 2 buds on each of both arms, accounting for 16 buds per vine.

The test consists of applying two drip irrigation treatments: overground and underground, in each of the four varieties. The trial design consisted of randomized blocks with six replicates per treatment, with five control plants per plot in the case of Garnacha, Juan García and Mencía, and with four replicates per treatment, with 15 control plants per plot in the case of Prieto Picudo. In both treatments, the dose was applied by water compensating drippers integrated inside the pipe, with flow rate of 2.3 L.h⁻¹, with pipes distances of 2.7 m and drippers distances of 0.5 m in the row.

The aerial drip pipe for irrigation was traditionally installed, holding it in a wire along the line, below the vine arms, at a height of approximately 30 cm over the ground. The underground pipe was installed in every between row space, 50 cm deep and 50 cm to the west of each line.

Annual rainfall collected in the study period was 347 mm, 332 mm, 353 mm and 326

mm in 2009, 2010, 2011 and 2012 respectively, with rainfall between April 1 and September 30 being 106 mm, 76 mm, 140 mm and 135 mm, respectively.

Water applications were made weekly from the vegetative growth main stopping, in mid-July, to the vintage, using a single dose corresponding to 20% of ETo in 2009, 2010 and 2011, and 25% of ETo in 2012. Total amount of irrigation water applied was 100 mm in 2009, 54 mm in 2010, 83 mm in 2011 and 115 mm in 2012.

The experimental determinations were number of bunches per vine, grape yield, bunch weight and berry weight, as production parameters. As vegetative growth parameters, number of shoots per plant, weight of pruning wood and shoot weight were determined. Finally, as parameters of grape quality, soluble solids concentration, pH and total acidity have been determined for each experimental treatment.

3. RESULTS

3.1. Vegetative development

A. Garnacha. Neither the total number of shoots or the shoot weight nor the weight of wood pruning showed statistically significant differences, however, there is a tendency for the underground irrigation to produce a pruning wood weight slightly greater than the overground irrigation, according to the greater shoot weight, despite of showing a slightly lower number of shoots.

Table 1. Average data of 2009, 2010, 2011 and 2012, for **Garnacha Tinta**, of number of clusters per vine (Clusters), grape production in Kg per vine (Prod.), cluster weight in g (Cl. W.), berry weight in g (Ber. W.), number of shoots per vine (Shoots), pruning wood weight in Kg per vine (Pr. W.), shoot weight in g (Sh. W.), total soluble solids in °Brix (TSS), pH and total acidity in g.L⁻¹ of tartaric acid (T.A.), for Underground (Und.) and Overground (Ov.) irrigation treatments. Level of statistical significance (Sig.): ns, not significant; *, p <0.05; ** p <0.01.

Garnacha	Clusters	Prod.	Cl. W.	Ber. W.	Shoots	Pr. W.	Sh. W.	TSS	pH	T.A.	
2009	Und.	17.6	2.79	126.7	1.62	14.9	0.79	53.2	23.70	3.36	5.66
	Ov.	23.0	3.55	161.4	1.48	15.7	0.76	48.3	22.35	3.36	5.18
	Sig.	**	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2010	Und.	21.1	2.79	126.8	1.49	15.9	0.81	51.7	22.70	3.31	6.66
	Ov.	21.3	3.63	164.9	1.54	16.4	0.77	47.5	23.65	3.39	5.76
	Sig.	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2011	Und.	18.5	2.33	105.7	1.79	17.7	0.73	42.0	23.57	3.42	5.97
	Ov.	11.4	1.42	64.8	1.72	19.7	0.68	34.9	23.33	3.41	6.09
	Sig.	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2012	Und.	28.8	4.38	199.1	1.25	16.3	0.64	39.4	22.73	3.35	4.21
	Ov.	30.3	4.22	191.9	1.20	16.7	0.61	36.3	22.83	3.41	4.11
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

B. Juan García. No statistically significant differences in vegetative growth parameters were observed, except in 2012 for pruning wood, but it has been observed that the underground irrigation produced more weight of pruning wood than overground irrigation, due to the higher individual shoot weight.

Table 2. Average data of 2009, 2010, 2011 and 2012, for **Juan García**, of number of clusters per vine (Clusters), grape production in Kg per vine (Prod.), cluster weight in g (Cl. W.), berry weight in g (Ber. W.), number of shoots per vine (Shoots), pruning wood weight in Kg per vine (Pr. W.), shoot weight in g (Sh. W.), total soluble solids in °Brix (TSS), pH and total acidity in g.L⁻¹ of tartaric acid (T.A.), for Underground (Und.) and Overground (Ov.) irrigation treatments. Level of statistical significance (Sig.): ns, not significant; *, p <0.05; ** p <0.01.

Juan García	Clusters	Prod.	Cl. W.	Ber. W.	Shoots	Pr. W.	Sh. W.	TSS	pH	T.A.	
2009	Und.	13.3	1.91	142.9	2.27	14.8	0.84	56.9	21.95	3.61	4.40
	Ov.	12.7	2.27	178.6	2.20	14.9	0.78	53.6	21.50	3.66	5.26
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2010	Und.	13.0	1.84	125.4	2.50	15.4	0.85	55.9	22.10	3.47	6.31
	Ov.	14.1	1.98	136.1	2.72	15.9	0.84	53.4	22.10	3.50	6.10
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2011	Und.	9.8	1.12	117.0	2.66	16.7	0.81	49.0	23.30	3.85	4.92
	Ov.	9.6	1.30	135.8	2.63	16.9	0.77	46.8	23.30	3.85	4.69
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2012	Und.	17.6	3.20	179.3	1.84	15.6	0.63	40.5	20.5	3.74	3.49
	Ov.	17.9	3.04	165.0	1.76	15.6	0.58	37.8	20.8	3.83	3.43
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

C. Mencía. Only in 2010 statistically significant differences in the parameters of vegetative growth were observed, but it has been observed a trend in favor of overground irrigation, which produced more weight of pruning wood than underground irrigation, due to the greater shoot weight.

Table 3. Average data of 2009, 2010, 2011 and 2012, for **Mencía**, of number of clusters per vine (Clusters), grape production in Kg per vine (Prod.), cluster weight in g (Cl. W.), berry weight in g (Ber. W.), number of shoots per vine (Shoots), pruning wood weight in Kg per vine (Pr. W.), shoot weight in g (Sh. W.), total soluble solids in °Brix (TSS), pH and total acidity in g.L⁻¹ of tartaric acid (T.A.), for Underground (Und.) and Overground (Ov.) irrigation treatments. Level of statistical significance (Sig.): ns, not significant; *, p <0.05; ** p <0.01.

Mencía	Clusters	Prod.	Cl. W.	Ber. W.	Shoots	Pr. W.	Sh. W.	TSS	pH	T.A.	
2009	Und.	21.6	3.19	145.1	1.74	16.4	0.68	42.4	23.45	3.59	4.64
	Ov.	21.1	3.12	146.4	1.69	16.3	0.74	45.9	23.70	3.64	4.50
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2010	Und.	17.4	2.87	165.7	1.71	17.1	0.74	43.2	23.70	3.80	4.56
	Ov.	17.9	3.24	181.6	1.70	17.2	0.85	50.0	24.20	3.77	4.65
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns
2011	Und.	15.4	2.07	134.8	1.71	20.6	0.74	37.0	24.78	3.79	4.51
	Ov.	13.5	1.74	123.7	1.85	21.9	0.81	37.4	24.09	3.90	4.13
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2012	Und.	25.9	5.86	227.1	1.72	16.6	0.84	51.1	22.45	4.20	4.28
	Ov.	26.0	6.07	234.6	1.85	17.3	0.94	53.9	22.36	4.04	4.49
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

D. Prieto Picudo. No statistically significant differences were observed in vegetative development parameters, however, it has been observed that underground irrigation produced more pruning wood than overground irrigation, due to the greater single shoot weight.

Table 4. Average data of 2009, 2010, 2011 and 2012, for **Prieto Picudo**, of number of clusters per vine (Clusters), grape production in Kg per vine (Prod.), cluster weight in g (Cl. W.), berry weight in g (Ber. W.), number of shoots per vine (Shoots), pruning wood weight in Kg per vine (Pr. W.), shoot weight in g (Sh. W.), total soluble solids in °Brix (TSS), pH and total acidity in g.L⁻¹ of tartaric acid (T.A.), for Underground (Und.) and Overground (Ov.) irrigation treatments. Level of statistical significance (Sig.): ns, not significant; *, p <0.05; ** p <0.01.

Prieto Picudo	Clusters	Prod.	Cl. W.	Ber. W.	Shoots	Pr. W.	Sh. W.	TSS	pH	T.A.	
2009	Und.	12.7	1.24	95.3	1.06	16.1	1.14	71.1	23.68	3.39	6.80
	Ov.	11.0	0.97	86.4	1.08	16.1	1.06	66.0	23.90	3.45	6.68
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
2010	Und.	13.9	1.98	140.3	1.26	16.7	1.24	74.1	23.50	3.26	8.03
	Ov.	14.1	2.00	140.2	1.27	16.5	1.14	69.3	23.30	3.28	7.69
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2011	Und.	14.8	1.50	100.2	1.74	19.3	1.17	60.9	25.07	3.56	5.58
	Ov.	12.9	1.38	105.0	1.73	19.0	1.09	57.8	25.24	3.61	5.30
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2012	Und.	16.5	1.93	118.6	0.89	17.1	0.85	49.5	23.41	3.54	5.15
	Ov.	15.1	1.46	96.5	0.84	16.5	0.76	46.6	23.47	3.54	5.18
	Sig.	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

3.2 Grape production

A. Garnacha. Although some components of grape yield showed statistically significant differences between treatments some years of study, there has not been observed a clear trend between types of irrigation, with predominance of overground in 2009 and 2010 and predominance of underground irrigation in 2011. The differences found each year were primarily due to the cluster weight (with significant differences in 2009 and 2010), more closely related to the number of berries than to the berry weight (generally higher in the underground irrigation, but without showing statistically significant differences in any case), but also due to the number of clusters in 2009 and 2011 (with significant differences) (table 1).

B. Juan García. None of the components of grape yield showed statistically significant differences between treatments, so the grape yield neither did, but it was found that the

yield was higher in the overground irrigation in 2009, 2010 and 2011, and in the underground irrigation in 2012, mainly due to higher cluster weight, more closely related to the number of berries than to the berry weight, but in any case the differences were statistically significant (table 2).

C. Mencía. No statistically significant differences in grape yield components. None clear trend between treatments is noticeable, changing from one year to another, such as the predominance of overground irrigation in 2010 and underground irrigation in 2011, in both cases due to the differences in bunch weight, which have been produced more due to the number of berries than to the berry weight (table 3).

D. Prieto Picudo. Although barely statistically significant differences between treatments were observed in some case in 2012, it was found that the grape yield was slightly higher in the underground watering more frequently (2009, 2011 and 2012) than in the overground irrigation. These observed differences were due largely to the number of clusters and the number of berries per cluster, which has generated a cluster of more weight, with very few differences due to the weight of berry, although without significant differences in these parameters (table 4).

Quality must

A. Garnacha. Sugar accumulation showed no statistically significant differences between the types of irrigation, neither a clear trend between both two, with higher values of underground irrigation in 2009 and 2011 and higher values of overground in 2010 and 2012. Neither the total acidity nor the pH showed statistically significant differences between treatments, although it has been observed more frequently than the underground irrigation presented a slightly higher level of total acidity (table 1).

B. Juan García. Neither statistically significant differences between treatments were observed in any of the must parameters, nor a definite trend between irrigation types, although the total acidity more frequently showed slightly higher level in the underground than in the overground irrigation (table 2).

C. Mencía. The accumulation of sugars showed no statistically significant differences between the types of irrigation, neither a clear trend between both. The total acidity and the pH showed no statistically significant differences between treatments, neither a definite trend among both treatments of irrigation (table 3).

D. Prieto Picudo. The accumulation of sugars showed no statistically significant differences between the types of irrigation, neither a clear trend between both. Neither the total acidity showed statistically significant differences between treatments, but the underground irrigation frequently presented values of acidity level slightly higher than the overground irrigation, as well as some tendency to slightly lower values of pH, resulting statistically significant difference in 2009 (table 4).

4. CONCLUSIONS

Grape production has shown no significant differences or trend between irrigation treatments applied, although in the case of cv. Juan García it has been observed more frequently than overground irrigation presented slightly higher values, while in Prieto Picudo was reversed. The productive differences observed were generally due to changes in the cluster weight, which have been due mainly to differences in the number of berries more than to the berry weight variation, which has been much more limited.

Vegetative growth has been slightly favored generally by underground irrigation, except for Mencía. The increase of pruning weight was mainly due to the greater shoot weight of underground irrigation.

The type of irrigation did not affect the sugar accumulation in must generally, with more variation between years in Garnacha Tinta than in the other three varieties. The acidity neither presented notable differences between treatments, but the underground irrigation showed more frequently a trend to higher acidity than the overground irrigation.

To sum up, the type of irrigation has barely affected grape production, while pruning wood has been favored by the underground irrigation. The sugar accumulation has not been substantially modified by the type of irrigation, but the level of acidity has frequently shown to be slightly higher with underground than with overground irrigation. Therefore, these results should be considered in a global assessment of advantages and disadvantages of each type of irrigation including operational, economic and environmental aspects.

5. BIBLIOGRAPHY

- Ayars J.E., Phene C.J., Hutmacher R.B., Davis K.R. Schoneman R.A., Vail S.S., Mead R.M. 1999. Subsurface drip irrigation of row crops: a review of 15 years of research at the Water Management Research Laboratory. *Agricultural Water Management* 42(1): 1-27.
- Bidondo D., Andreau R., Martinez S., Garbi M., Chale W., Cremaschi G. 2010. Comparison of the Effect of Surface and Subsurface Drip Irrigation on Water Use, Growth and Production of a Greenhouse Tomato Crop. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC) 927: 309-313.
- Camp C.R. 1998. Subsurface drip irrigation: A review. *Transactions of the Asae* 41(5): 1353-1367.
- Edraki M., Krstic M. 2005. Sustained deficit irrigation of winegrapes in a semi-arid horticultural region of Australia. *Water Resources Management III Book Series: Wit Transactions on Ecology and the Environment* 80: 545-555.
- Holzapfel E., Pannunzio A., Lorite I. Silva de Oliveira A.S., Farkas I. 2009. Design and Management of Irrigation Systems. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69 (Suppl. 1): 17-25.
- Romero P., García J., Botía P. 2006. Cost-benefit analysis of a regulated deficit-irrigated almond orchard under subsurface drip irrigation conditions in Southeastern Spain. *Irrigation Science* 24(3): 175-184.
- Ruiz-Sánchez M.C., Domingo R., Castel J.R. 2010. Review. Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(S2): S5-S20.

Acknowledgements

The development of this work has been possible thanks to financial support from Junta de Castilla y León and FEDER funds, and cooperation of colleagues of Group of Viticulture at the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

EFFECTOS DEL USO DE UNA CUBIERTA VEGETAL EN EL RENDIMIENTO, VIGOR Y CALIDAD DE LA UVA

Pilar RAMÍREZ; Jesús LASHERAS; Juan Manuel LEÓN; Ana Isabel LUCENA; José MORALES

IFAPA Centro de Cabra. Ctra. Cabra-Doña Mencía, km 2.5, 14940 Cabra (Córdoba)

RESUMEN

Durante seis años se ha evaluado el efecto de la implantación de una cubierta vegetal en el rendimiento, vigor y calidad de la uva. Las cepas están podadas en cordón doble, con sistema de empalme en espaldera y cultivadas en secano. Los tratamientos fueron: cubierta vegetal sembrada (CV) a una dosis de 15 kg/ha de *Lolium rigidum* (ballico) y 50 kg/ha de *Hordeum vulgare* (cebada), frente a laboreo (L). En el rendimiento solo se encontraron diferencias significativas en uno de los seis años de estudio, donde el uso de las cubiertas provocó una reducción del 34% de la producción, así como una disminución del tamaño de las bayas. Ese mismo año también se produjo una reducción del vigor. El contenido de sólidos solubles en el momento de la vendimia, fue superior en el tratamiento de cubierta vegetal solo en el año 2009, no encontrando diferencias entre tratamientos en los otros cinco años. En tres de los cinco años evaluados, el contenido de antocianos fue superior en el tratamiento de cubierta vegetal.

Palabras clave: ballico, Cabernet Sauvignon, cebada, laboreo, viñedo.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del suelo a través de cubiertas vegetales aporta una serie de ventajas de tipo agronómico y vitícola, con respecto al laboreo tradicional, que contribuyen al manejo racional del cultivo. En los viñedos del entorno mediterráneo, las cubiertas vegetales constituyen una herramienta adecuada para contener, a través de la competencia establecida con el viñedo por el agua y los nutrientes, tanto la expresión vegetativa del viñedo como su potencial productivo. A partir de estas condiciones, resulta factible alcanzar un equilibrio adecuado entre la componente productiva y vegetativa, lo que a su vez puede favorecer una mejor exposición y microclima de racimos, logrando aumentar la calidad de los mostos y vinos producidos (IBAÑEZ *et al.*, 2011a).

El uso de cubiertas vegetales en la viña es una técnica muy empleada desde antiguo en zonas de pluviometría elevada y especialmente en viñedos con pendiente (LISA, 1995), mientras que en zonas de baja pluviometría, es conocido el efecto depresivo sobre la vegetación ya que puede ser negativo sobre la producción (ZARAGOZA y DELGADO, 1996).

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de una cubierta vegetal en cv. Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) cultivada en clima cálido, sobre la producción, el vigor y la calidad de la uva.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se ha realizado desde el año 2007 hasta 2012, en un viñedo de la finca experimental del IFAPA Centro de Cabra (Córdoba). El material vegetal ha sido cv. Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) injertada sobre el portainjerto 161-49C. El marco de plantación es de 2.5 x 1.2 m, el sistema de poda es cordón doble con 16 yemas por cepa, conducidas en espaldera y el cultivo es seco.

La zona se caracteriza por una temperatura media anual de 13.6 °C, con una máxima media del mes más cálido (julio) de 36.7 °C y una mínima media del mes más frío (enero) de 2.3 °C. La precipitación media anual es de 740 mm, repartidos de otoño a primavera, siendo los meses más secos junio, julio y agosto. Las precipitaciones de los años 2007, 2008, 2011 y 2012, se sitúan por debajo de la media anual con 533, 688, 491 y 601 mm, respectivamente, mientras que 2009 y 2010 fueron más lluviosos con 857 y 1058 mm, respectivamente. La distribución anual de las precipitaciones y de la evapotranspiración de referencia se representa en la Figura 1.

El diseño del ensayo ha sido en bloques al azar con tres repeticiones, cada parcela elemental consta de tres filas de cuarenta y siete cepas cada una y dos calles, siendo la fila intermedia la utilizada para todos los controles. Se han aplicado dos tratamientos, cubierta vegetal sembrada temporal entre hileras (desde octubre hasta finales de marzo) y laboreo. Las filas de viñedo se mantuvieron sin malezas en ambos casos, mediante el uso de herbicidas.

La siembra en el tratamiento de cubierta vegetal se ha hecho a una dosis de 15 kg/ha de *Lolium rigidum* (ballico) y 50 kg/ha de *Hordeum vulgare* (cebada) y su control se ha

llevado a cabo mediante desbrozado mecánico, mientras que el tratamiento de laboreo se ha mantenido anualmente libre de vegetación espontánea mediante pases de cultivador.

En vendimia se determinó la producción unitaria (kg/cepa) y el peso de 100 bayas (g). Se realizaron las siguientes determinaciones físico-químicas: sólidos solubles (° Brix), acidez titulable (g/l), pH y ácido málico (g/l) (DOCE, 1990), ácido tartárico (REBELEIN, 1973), taninos (g/l) (AWRI, 2007) y antocianos totales y extraíbles (mg/l) (RIBERAU-GAYON y STONESTREETS, 1966), aunque estos tres últimos parámetros no fueron determinados en 2007. Después de la caída de la hoja y coincidiendo con la poda se caracterizó el vigor de las cepas a través del peso de madera de poda (kg/cepa).

A los datos obtenidos se les ha realizado un análisis de la varianza, para una fuente de variación (manejo del suelo), mediante el programa Statistix 8.0.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En los dos primeros años de implantación de la cubierta vegetal sembrada (2007 y 2008) se redujo de manera significativa el peso de la madera de poda ($p < 0.05\%$), lo que se traduce en un menor vigor de las cepas (Figura 2). Este efecto de competencia durante los primeros años de implantación de la cubierta, y la posterior estabilización del vigor de la planta, concuerda con los resultados obtenidos por AGUIRREZÁBAL *et al.* (2011). La producción solo resultó afectada en el año 2008, en el que la cubierta vegetal provocó una reducción del 34% del rendimiento, con diferencias significativas respecto del laboreo (Figura 3). En ese año el peso de las bayas fue significativamente menor en las cepas cultivadas con cubierta vegetal (Figura 4).

Respecto a los parámetros físico-químicos del mosto (Tabla 1), el contenido de sólidos solubles tiende a ser superior en el tratamiento de cubierta vegetal, aunque solo se encontraron diferencias significativas en 2009. Este comportamiento podría ser debido al déficit hídrico moderado que proporciona la gestión del suelo de un viñedo mediante cubierta vegetal, que por lo general, favorece la acumulación de azúcares en la baya (CHAVES *et al.*, 2010). En los demás parámetros, se han encontrado diferencias significativas en el pH y en el ácido tartárico en el año 2010, siendo el tratamiento de laboreo el que presentaba valores de pH más bajos y de ácido tartárico más elevados. En el año 2012 el

tratamiento de laboreo presentó una mayor acidez total que el de cubierta vegetal. Aunque la variación de la acidez puede estar condicionada por diversos factores de tipo climático o cultural, parece que la mayor parte de las experiencias desarrolladas en el entorno mediterráneo muestran una tendencia a la reducción de la acidez por efecto de la cubierta vegetal (ALBURQUERQUE *et al.*, 2008; AGUIRREZÁBAL *et al.*, 2011; GIRALT *et al.*, 2011; IBAÑEZ *et al.*, 2011b). Este efecto podría ser debido a la menor disponibilidad hídrica en el tratamiento de cubierta vegetal que provoca una menor síntesis de ácidos orgánicos (ROYO *et al.*, 2005).

En cuanto a los parámetros relativos a la madurez fenólica de las uvas, se han encontrado diferencias significativas en los antocianos en los años 2008, 2010 y 2012, y en los taninos en los años 2009 y 2012 (Tabla 2). Los antocianos se encuentran en una mayor concentración en el tratamiento de cubierta vegetal en esos años, lo que coincide con los resultados obtenidos por IBAÑEZ *et al.* (2011b). Respecto a la influencia que la cubierta vegetal ejerce sobre el contenido de taninos, la tendencia no es clara; mientras que en 2009 la concentración es mayor en el tratamiento de laboreo que en el de cubierta vegetal, en 2010 ocurre lo contrario, no encontrando los otros tres años diferencias entre tratamientos.

El uso de una cubierta vegetal sembrada temporal, ha afectado al vigor de las plantas en los dos primeros años de su instalación, mientras que a la producción solo en el segundo año. Respecto a la calidad de la uva se observa una tendencia en el aumento de antocianos en los frutos procedentes del tratamiento de cubierta vegetal.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Parámetros físico-químicos del mosto en vendimia en los dos tratamientos evaluados (2007-2012)

		Sólidos solubles (°Brix)	pH	Acidez total (g/l)	Ácido tartárico (g/l)	Ácido málico (g/l)
2007	Cubierta vegetal	23.5	3.39	5.6	9.6	0.5
	Laboreo	22.7	3.31	5.9	10.1	0.7
	Significación	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2008	Cubierta vegetal	22.7	3.23	6.0	10.2	2.4
	Laboreo	22.0	3.28	5.8	9.2	2.9
	Significación	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2009	Cubierta vegetal	22.4	3.20	7.4	9.5	2.7
	Laboreo	21.2	3.21	7.8	9.9	3.0
	Significación	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2010	Cubierta vegetal	22.2	3.45	5.7	6.9	2.3
	Laboreo	21.1	3.33	6.6	8.4	2.4
	Significación	n.s.	*	n.s.	*	n.s.
2011	Cubierta vegetal	21.6	3.40	6.4	7.6	2.5
	Laboreo	20.5	3.33	7.1	9.1	2.7
	Significación	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2012	Cubierta vegetal	23.4	3.21	7.8	11.2	1.7
	Laboreo	23.5	3.21	8.4	12.2	2.0
	Significación	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

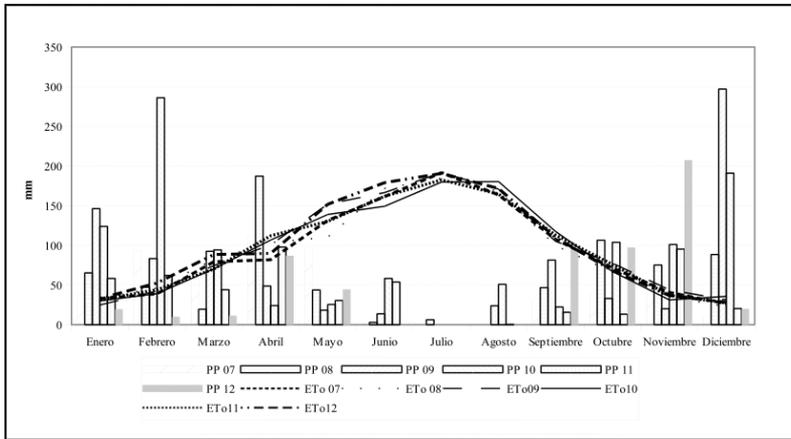


Figura 1: Distribución mensual de las precipitaciones (PP) y la evapotranspiración de referencia (ET.) durante los seis años de estudio.

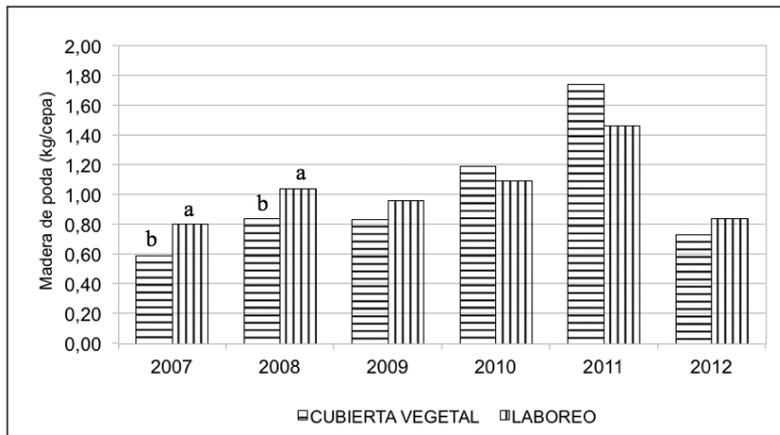


Figura 2: Peso de madera de poda (kg/cepa) en los dos tratamientos evaluados (2007-2012)

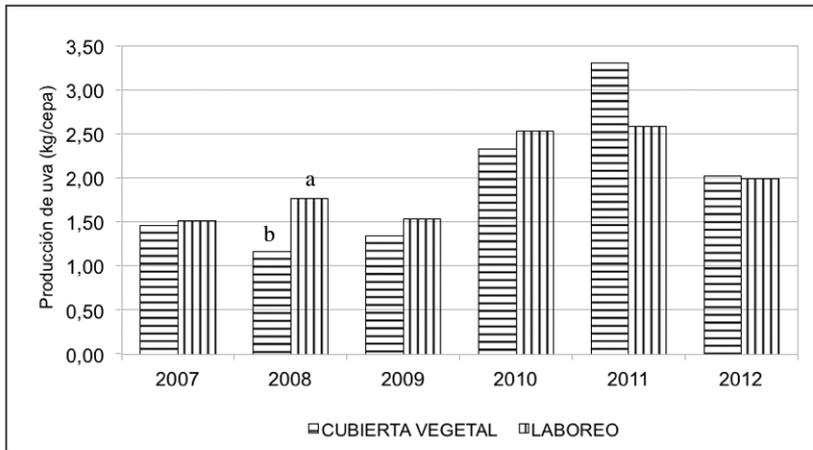


Figura 3: Producción (kg/cepa) en los dos tratamientos evaluados (2007-2012)

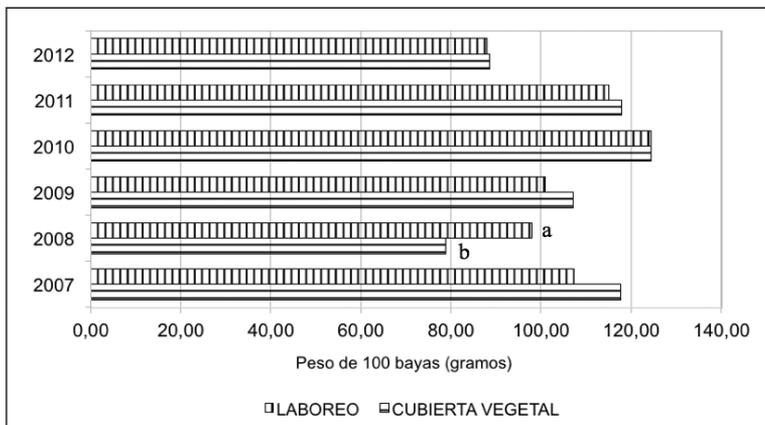


Figura 4: Peso de cien bayas (g) en los dos tratamientos evaluados (2007-2012)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRREZÁBAL, F., SAGÜÉS, A., CIBRIÁIN, F., SUBERVIOLA, J. 2011. Cubiertas vegetales en viña. Disponible en: <http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/83D1771D-58D6-4350-B510-EC8541886C8C/203917/ArticuloCubiertas1.pdf> (10/04/2012).
- ALBURQUERQUE, M.V., YUSTE, R., YUSTE, J. 2008. Influencia de las cubiertas vegetales de suelo en un viñedo de Tempranillo en la D.O. Rueda. *Viticultura Enología Profesional*, 114: 34-41.
- AWRI, 2007. AWRI Standard Methods. Determination of tannins in grapes and red wine using the MCP (methyl cellulose precipitable) tannin assay. www.crcv.com.au
- CHAVES, M.M., ZARROUK, O., FRANCISCO, R., COSTA, J.M., SANTOS, T., REGALADO, A.P., RODRIGUES, M.L., LOPES, C.M. 2010. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105:661-676.
- DOCE, 1990. Reglamento (CEE) 2676/90 de la Comisión, de 17 de septiembre, por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. DOCE. L 272, 03/10/1990.
- GIRALT, L., DOMINGO, C., CATALINA, O., ROVIRA, R. 2011: La coberta vegetal com a tècnica de maneig del sòl a la vinya. Proyecto REDBIO. Disponible en: http://www.ruralcat.net/migracio_resources/DLFE-19219.pdf/1.0.pdf (10/04/2012).
- IBAÑEZ, S. PÉREZ, J.L., PEREGRINA, F. y GARCÍA-ESCUADERO, E., 2011a. Utilización de cubiertas vegetales en viñedos de la D.O.Ca. Rioja. XXXIV World Congress of Vine and Wine. Oporto, 20-27 jun.
- IBAÑEZ, S., PÉREZ, J.L., PEREGRINA, F., GARCÍA-ESCUADERO, E. 2011b. La cubierta vegetal como sistema alternativo de mantenimiento de los suelos de viñedo en la D.O.Ca. Rioja. *Zubía*, 29:133-148.
- LISA, L., 1995. Essais d'enherbement por le controle de l'érosion du sol dans des vignoles du pie-mont. Reunion Groupe E VRS " vignobles". Friburgo.
- REBELEIN, H., 1973. Precise routine determination of tartaric and lactic acid in wine and similar beverages. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2:112-121.
- RIBERAU-GAYON, P. y STONESTREETS, E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Anal.* 48:188-196.
- ROYO, J.B., MIRANDA, C., ZABALEGUI, S., GONZAGA, L. 2005. Interés del uso de cubiertas vegetales como herramientas para el manejo del estrés hídrico en vid. Actas V Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Oporto (Portugal): 440-445.
- ZARAGOZA, C. y DELGADO, I., 1996. Un ensayo de coberturas vegetales en viña. ITEA. 17:404-405.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados han sido obtenidos en el marco del proyecto Transforma vid y vino del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), cofinanciado al 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, dentro del Programa Operativo FEDER de Andalucía 2007-2013.

SAP FLOW AND VARIATION ON STEM DIAMETER TO DETERMINE THE WINEGRAPE WATER STATUS

Manuel OLIVEIRA¹; Carlos CASTRO²; Maria José CORREIA³; Rui COSTA⁴; Ana Alexandra OLIVEIRA⁵

ABSTRACT

Vineyards in Northwestern Portugal are often subjected to intense water stress that may cause them damage and Irrigation when properly managed can play an important role in fruit yield and quality. To manage the vineyard water supply we need indicators that permit the assessment of the plant water status along the growing season. We hypothesized that simultaneous readings of sap flow and variation of the stem diameter of plants in the field might constitute a reliable indicator of the water status, eventually, representative of the vineyard. In 2011 a number of plants were fitted of sap flow meters and dendrometers. Half of the plants were irrigated and the other rainfed. The sap flow rate and the stem diameter variation were studied during the growing season. The results of 2012 are presented and discussed here. The stem diameter variation is a sensitive indicator that can be used for management decisions but its cost and sampling limitations might prevent its use at field scale.

Key words: *Vitis vinifera*, stem diameter, sap flow, Cumulative Sum

1 - INTRODUCTION

Monitoring of plant water status in field grown grapevines does allow diagnosing the onset and severity of water stress so as to schedule irrigation according to the actual plant needs (Patakas *et al.*, 2005). Recently, that diagnose in fruit tree orchards and vineyards is frequently based on changes in the stem diameter (Doltra *et al.*, 2007) or from sap-flow records (Fernandez *et. al.*, 2008; Poblete-Echeverria *et al.*, 2012). Plant growth is a sensitive indicator of water stress and it has been demonstrated that trends in trunk

¹ CITAB – Agronomy, UTAD, Vila Real. mto@utad.pt;

² Agronomy, UTAD, Vila Real. ccastro@utad.pt;

³ Agronomy, UTAD, Vila Real, mjosec@utad.pt;

⁴ Agronomy, UTAD, Vila Real, ruicosta@utad.pt;

⁵ Agronomy, UTAD, Vila Real. anaolive@utad.pt

growth are indicative of the adequacy of irrigation (Ortuno *et al.*, 2010). Electronic dendrometers permit accurate and continuous measurements of trunk diameter fluctuations and might provide real time automated registers of the plant water status and plant growth (Cifre *et al.*, 2005).

Sap flow measurements give reliable, direct estimates of plant or shoot water loss without disturbing the conditions of the leaf environment and there is evidence that supports the use of sap flow measurements to schedule irrigation because they are sensitive enough to detect early signs of water stress (Fernandez *et al.*, 2001, 2008; Fernandez and Cuevas, 2010). It was already demonstrated that diurnal stem diameter variations closely track sap flow (Escalona *et al.*, 2002; de Schepper *et al.*, 2012).

Both dendrometers and sap flow hardware are sensitive equipment that requires some extensive wiring that might interfere with the vineyard management and can be easily damaged. In addition, they are expensive and require electronic loggers to record their measurements. An experimental field was set up in 2011 to determine the reliability of dendrometers and sap flow to detect signs of water stress in a Touriga nacional vineyard under commercial management and how they might interfere with the regular agronomic practices. This work reports on the results obtained in 2012.

2 - MATERIALS AND METHODS

A commercially managed vineyard located at the UTAD campus (41.285579, -7.738087) was chose in 2011 to set up the experiment. Twelve grapevine plants (*Vitis vinifera* L.), disease free, about the same age and trunk size (about 5 cm in diameter) were set into two groups of 6 adjacent plants each. The grapevines were pruned on a double gouyt and trellised to form a hedge of about 1,6 m high and 0,9 m wide at full canopy expanse. One group was irrigated from early flowering (15 Jun 2012) to the onset of veraison (12 Aug 2012) at the rate of 3 mm day⁻¹ and the others were rain fed. One plant on each group was fitted on the main stem with a linear transducers of displacement (dendrometer) 5 cm above the grafting crown and with thermal dissipation sap velocity probes (sap flow) 5 cm above the dendrometer that were wired to a data logger (Dynamax, USA; Delta-T Devices, UK) that recorded the hourly averages of readings taken every 10 minutes. The readings took place between 1 June and 30 September 2012 (stem di-

ameter) and between 25 May and 31 August (sap flow). The variables derived from the dendrometers raw data are seen in Table 1.

Table 1 – Variables derived from dendrometer raw data

Variable	Definition	Calculation
MXSD	24 hour maximum stem diameter	
MNSD	24 hour minimum stem diameter	
MDS	maximum daily shrinkage	MXSD(i)-MNSD(i)
DR	daily recovery	MXSD(i+1)-MNSD(i)
DG	daily growth	MXSD(i+1)-MXSD(i)
SGR	stem growth rate	MXSD(i)-MXSD(i-n)
CG	cumulative growth	$\sum_{i=1}^n \text{DG}(i)$

The sap flow (SF) is presented as the daily harmonic mean of the flow rates ($L \text{ dm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) recorded during 24 hour periods.

The raw data was statistically analyzed to objectively determine the trend variations on stem growth, on sap flow and how close they track each other. The method used was the cumulative sum chart (CumSum) defined as (Eriksson *et al.*, 2006):

$$C_m = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})$$

The CumSum at time step m is the sum of the differences between the previous observations and \bar{x} , the estimated mean value of all observations. The CumSum chart is a statistical process control tool, which detects up or down drifts and abrupt changes in the mean (Korpela *et al.*, 2010).

The five vines on the vicinity of the one fitted with dendrometer and sap flow, were sampled for their berries to determine their growth.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

The dendrometer data shows that the irrigated vine had a stem cumulative growth during the measurement period of 202.34 μm and the rain fed had -209.21 μm . The variation pattern of stem diameter showed that the fluctuations of the rain fed plant were more accentuated than those of the irrigated vine. Thus, the rain fed vine had an average of 56.29 μm for MSD, 55.44 μm for DR that resulted in a negative DG of -0.60 μm . The

averages for the irrigated vine were MSD 101.99 μm , DR 106.08 μm and DG 3.78 μm . The data presented as a CumSum chart (figs. 1, 2) shows that the stem diameter of the rain fed vine was kept constant till the flowering period as the daily shrinkage was offset by the daily recovery. After flowering, the daily shrinkage was not totally offset and the stem diameter was decreasing constantly. At the onset of veraison, DR was larger than the shrinkage and the stem grew larger but not enough to reach the size it had before flowering. This resulted on a net decrease of the stem diameter from flowering to the end of the reading period.

The stem diameter of the irrigated vine fluctuated before the flowering but the overall result of that period was an unchanged diameter. Once the irrigation started after flowering, the stem grew larger as the daily shrinkage was surpassed by the recovery. In late July, the recovery was smaller than the shrinkage and the diameter decreased. When the irrigation was suspended in mid-August, there was a sudden change in the daily pattern but the decrease continued only to recover in the later days of the observation period and the result was a net gain of the stem diameter.

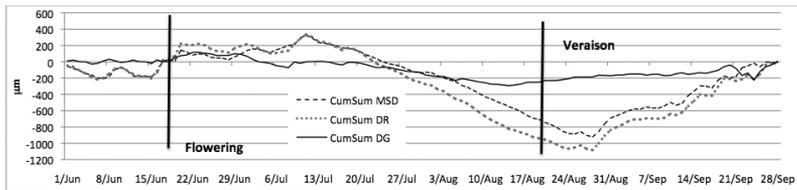


Figure 1 – Cumulative Sum of Maximum Daily Shrinkage (MDS), Daily Recovery (DR), and Daily Growth (DG) of rain fed grapevine, UTAD from 1 Jun - 31 Aug 2012

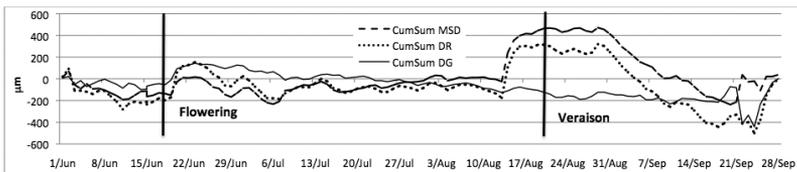


Figure 2 – Cumulative Sum of Maximum Daily Shrinkage (MDS), Daily Recovery (DR), and Daily Growth (DG) of irrigated grapevine, UTAD from 1 Jun - 31 Aug 2012.

The variation of stem diameter is sensitive to the addition of soil water (Lubczynski, 2009) and the berry development (de Scheppera *et al.*, 2010). The irrigated vine had a net gain in diameter while the diameter of the rain fed shrank and the daily shrinkage of the diameter overcame its daily recovery about 15 days earlier for the rain fed plant relatively to the irrigated one and this results concur with previous works that draw a relationship between growth and available water (Ortuno *et al.*, 2010; Sofoa *et al.*, 2012). The stem diameter of both plants was negatively affected when the berries started growing.

The evolution of the berries size and weight followed closely the results obtained by other authors (Acevedo-Opazo *et al.*, 2010; Sofoa *et al.*, 2012). The berries grew from fruit setting to maturation in both equatorial diameter and weight except the ones from rain fed plants that shriveled in the later stages (fig.3). The incremental growth of the berries decreased till the onset of veraison and gathered pace afterwards till maturation (fig.4). The equatorial diameter and the weight of the berries for the rain fed vines reached, respectively, 12.697 mm and 1.650 g, while for the irrigated plants were, respectively, 19.862 mm and 3.281 g.

The growing berries competed for the water (Intrigliolo and Castel, 2007), but the rate reduction was smaller for the irrigated plant. Once the irrigation was suspended (12 August), the variation rate of the stem diameter in irrigated plants showed an almost immediate change (14 August).

The sap flow daily variations showed the regular pattern already observed in other research works with a decreasing flow during the night and increasing during the day in response to higher evaporative demand from the atmosphere. The mean flow is 2,0 and 2,5 L dm⁻² h⁻¹, respectively, for rain fed and irrigated grapevines. The sap flow values were very similar on both vines before the irrigation period, they became divergent during irrigation, to converge again when irrigations was suspended. The rain fed vine started increasing the flow rate at lower level than the other vine in early June and once the irrigation started the irrigated plant kept an higher rate at all times till irrigation was suspended when the rates on both vines converged (fig. 5).

The sap flow rate depends on water availability (Cifre *et al.*, 2005) but also on the atmospheric conditions (Pataki and Oren, 2003) and on the plant control such as stomatal

conductance (Buckley, 2005). The overall results show that the plant with more available water had a higher sap flow rate but the rate change showed a considerable lag to changing conditions such as starting and suspension dates of irrigation and the berry development. Contributing factors are the delay between leaf transpiration and soil water uptake (de Schepper *et al.*, 2012), the lesser sensitivity of sap flow to competition from the berries (Daudet *et al.*, 2005) and the strong influence of the atmospheric conditions that were not evaluated in this work.

The correlation between MDS and SF is highly significant ($P < 0.001$) but negative as expected because plant transpiration draws water from the plant tissues (de Schepper, 2012). However the inflexion points of SF and MDS do not juxtapose and lag apart for several days. The peculiarities of these indicators may lie partially in fact that MDS depends mainly on the water stored in the phloem and in the outer xylem, while SF depends more on the level of hydration of the whole sapwood (Fernandez and Cuevas, 2010).

The presence of the sensors, data logger and the wiring linking them is an obstacle to regular management practices of the vineyard because extra care must be taken to prevent them damage, in special, during mechanical operations. Wires can be severed and the dendrometers are easily displaced if touched. The equipment cost and the difficulties created to traffic do prevent the observations on a large number of plants that might raise the question of the sampling significance.

4 - CONCLUSIONS

Stem diameter variation and sap flow rate are good indicators of the plant water status but the first is more sensitive and thus adequate to evaluate the onset of plant water stress and its severity.

Sampling limitations at field scale are a serious drawback on the use of either stem diameter variation or sap flow rate for management decisions.

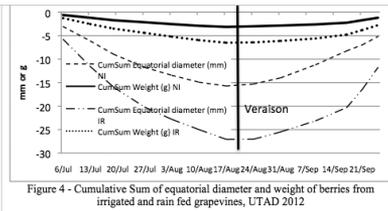
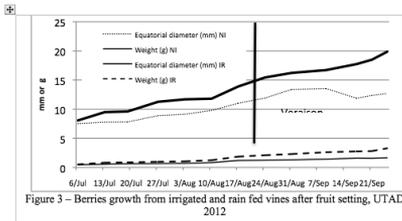


Figure 3 – Berries growth from irrigated and rain fed vines after fruit setting, UTAD 2012

Figure 4 - Cumulative Sum of equatorial diameter and weight of berries from irrigated and rain fed grapevines, UTAD 2012

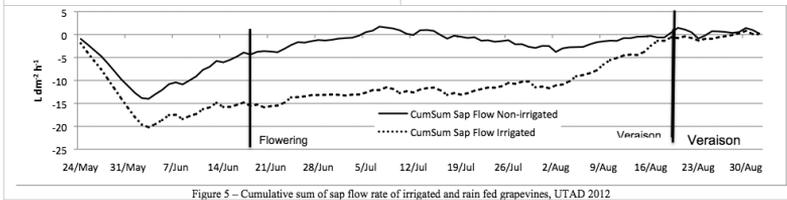


Figure 5 – Cumulative sum of sap flow rate of irrigated and rain fed grapevines, UTAD 2012

REFERENCES

- Acevedo-Opazo, C.; Ortega-Farias, S.; Fuentes, S. (2010). Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. *Agric. Water Managnt.* 97:956-964.
- Buckley, T.N. (2005). The control of stomata by water balance. *New Phytologist* 168:275-292.
- Cifre, J.; Bota, J.; Escalona, J.M.; Medrano, H.; Flexas, J. (2005). Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.) An open gate to improve water-use efficiency? *Agric. Ecosys. Environ.* 106:159-170.
- Daudet, F.A.; Ameglio, T.; Cochard, H.; Archilla, O.; Lacoite, A. (2005). Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations. *J. Exp. Bot.* 56:135-144.
- de Schepper, V.; van Dusschoten, D.; Copini, P.; Jahnke, S.; Steppe, K. (2012). MRI links stem water content to stem diameter variations in transpiring trees. *J. Exper. Bot.* 63:2645–2653.
- de Scheppera, V.; Steppe, K.; van Labeke, M.C.; Lemeur, R. (2010). Detailed analysis of double girdling effects on stem diameter variations and sap flow in young oak trees. *Environ. Exp. Bot.* 68:149-156.
- Doltra, J.; Oncins, J.A.; Bonanay, J.; Cohen, M. (2007). Evaluation of plant based water status indicators in mature apple trees under field conditions. *Irrig. Sci.* 25:351–359.
- Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Trygg, J.; Wikstrom, C.; Wold, S. (2006). MULTI-AND MEGAVARIATE DATA ANALYSIS. Part I. Basic Princlples and Applications. Umet-

- rics AB, Sweden.
- Escalona, J., Flexas, J., Medrano, H. (2002). Drought effects on water flow, photosynthesis and growth of potted grapevines. *Vitis* 41:57–62
- Fernandez, J.E.; Cuevas, M.V. (2010). Irrigation scheduling from stem diameter variations: A review. *Agric. Forest Meteor.* 150:135–151.
- Fernandez, J.E., Palomo, M.J., Diaz-Espejo, A., Clothier, B.E., Green, S.R., Giron, I.F., Moreno, F. (2001). Heat-pulse measurements of sap flow in olives for automating irrigation: tests, root flow and diagnostics of water stress. *Agric. Water Managnt.* 51:99-123.
- Fernandez, J.E., Green, S.R., Caspari, H.W., Diaz-Espejo, A., Cuevas, M.V. (2008). The use of sap flow measurements for scheduling irrigation in olive, apple and Asian pear trees and in grapevines. *Plant Soil* 305:91-104.
- Intrigliolo, D.S., Castel, J.R. (2007). Evaluation of grapevine water status from trunk diameter variations. *Irrig. Sci.* 26:49-59.
- Korpela, M.; Makinen, H.; Nojd, P.; Hollmen, J.; Sulkava, M. (2010). Automatic detection of onset and cessation of tree stem radius increase using dendrometer data. *Neurocomputing* 73:2039-2046.
- Lubczynski, M.W. (2009). The hydrogeological role of trees in water-limited environments. *Hydrogeology J.* 17:247-259.
- Ortuno, M.F.; Conejero, W.; Moreno, F.; Moriana, A.; Intrigliolo, D.S.; Biel, C.; Mellisho, C.D.; Perez-Pastor, A.; Domingo, R.; Ruiz-Sanchez, M.C.; Casadesus, J.; Bonany, J.; Torrecillas, A. (2010). Could trunk diameter sensors be used in woody crops for irrigation scheduling? A review of current knowledge and future perspectives. *Agric. Water Managnt.* 97:1-11.
- Patakas, A.; Noitsakis, B.; Chouzouri, A. (2005). Optimization of irrigation water use in grapevines using the relationship between transpiration and plant water status. *Agric. Ecosys. Environ.* 106:253-259.
- Pataki, D.E.; Oren, R. (2003). Species differences in stomatal control of water loss at the canopy scale in a mature bottomland deciduous forest. *Adv. Water Resour.* 26:1267-1278.
- Poblete-Echeverria, C.; Ortega-Farias, S.; Zuniga, M.; Fuentes, S. (2012). Evaluation of compensated heat-pulse velocity method to determine vine transpiration using combined measurements of eddy covariance system and microlysimeters. *Agric. Water Managnt.* 109:11–19.
- Sofoa, A.; Nuzzo, V.; Tataranni, G.; Manfra, M.; De Nisco, M.; Scopa, A. (2012). Berry morphology and composition in irrigated and non-irrigated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Phys.* 169:1023-1031.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO DESENVOLVIMENTO RÚRIS

Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

Com o apoio / Supported by    