

ÉVORA. PORTUGAL

10º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO
10TH ALENTEJO VINE AND WINE SYMPOSIUM

10º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO

10TH ALENTEJO VINE AND WINE SYMPOSIUM

4-5-6 / 05 / 2016

ÉVORA. PORTUGAL

VOLUME I

ORGANIZAÇÃO



PATROCÍNIOS



APOIOS



VOLUME
I

LIVRO DE ATAS

10º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO (1º Volume)

4 – 5 – 6 DE MAIO 2016

Organizado por:

ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

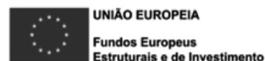
CVRA – Comissão Vitivinícola Regional Alentejana

CCDRA – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento da Região Alentejo

DRAPAL – Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

UE – Universidade de Évora

Com o patrocínio de:



Com o apoio de:



ATAS

Comissão Executiva

ATEVA – Francisco Mata

CVRA – Francisco Mateus

CCDRA – Francisco Sabino

DRAPAL - Francisco Murteira

UE – João Mota Barroso

Conselho Científico

Professora Helena Oliveira – Instituto Superior de Agronomia

Professor António Mexia - Instituto Superior de Agronomia

Professora Cecília Rego - Instituto Superior de Agronomia

Dr. António Sérgio Curvelo Garcia – Estação Vitivinícola Nacional

Professor Dr. Jorge Ricardo Silva - Instituto Superior de Agronomia

Professor Antero Martins - Instituto Superior de Agronomia

Dr. 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 Dr. 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 Ministro da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, Dr. Luís Manuel Capoulas Santos

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

- Dr. Roberto Grilo - Presidente da Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Alentejo
- Prof. Ana Costa Freitas - Reitora da Universidade de Évora
- Eng^o Francisco Mateus – Presidente da Direcção da Comissão Vitivinícola Regional do Alentejo
- Eng^o Francisco Murteira – Diretor Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo
- Sr. Hernâni Ventura Capucho – Presidente da Direcção da Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

SESSÃO II

Material Vegetal

Presidente da sessão: Dr. José Eduardo Jorge Eiras-Dias (Estação Vitivinícola Nacional)

CONFERÊNCIA I

Doenças do Lenho – David Gramaje - «Manejo de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid en viveros y nuevas plantaciones»

SESSÃO II

Fitossanidade

Presidente da Sessão: Prof. António Mexia (ISA Lisboa)

SESSÃO III

Enologia 1

Presidente da Sessão: Prof. Dr. Jorge Ricardo Silva (ISA Lisboa)

CONFERÊNCIA II

Economia – Mike Veseth – Wine Wars: Key Trends in the Global Wine Economy

Moderador: A confirmar

SESSÃO IV

Enologia 2

Presidente da Sessão: Prof. António Sérgio Curvelo Garcia (Estação Vitivinícola Nacional)

CONFERÊNCIA III

Mercados Internacionais – Nuno Vale (Viniportugal) – Desafios do Sector à Promoção Internacional

Moderador: Eng^o Francisco Mateus (CVRA)

SESSÃO V

Tecnologia Vitícola 1

Presidente da Sessão: Prof. Rogério de Castro (ISA Lisboa)

Conferência IV

Sustentabilidade – Ettore Capri – Building National and International Stakeholder Platform for the Wine Sustainability

Moderador: Eng^o João Barroso (CVRA)

SESSÃO VI

Tecnologia Vitícola 2

Presidente da Sessão: Prof. Jorge Queiroz (Universidade do Porto)

SESSÃO VII

Viticultura e Terroir

Presidente da Sessão: Prof. João Mota Barroso (Universidade de Évora)

CONFERÊNCIA VI

Vinho de Talha – Paul White (Oxford University) e Irakli Cholobargia (National Wine Agency, Georgia) - As novas tendências

Moderadora: Prof. Raquel Ventura (Universidade de Évora)

SESSÃO VIII

Economia e Marketing

Presidente da Sessão: Prof. Raquel Ventura (Universidade de Évora)

SESSÃO DE ENCERRAMENTO - Presidida por Sua Ex^a o Secretário de Estado da Agricultura e Alimentação, Dr. Luís Medeiros Vieira

ALOCUÇÕES DE ENCERRAMENTO

- Dr. Roberto Grilo - Presidente da Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Alentejo
- Prof. Ana Costa Freitas - Reitora da Universidade de Évora
- Eng^o Francisco Mateus – Presidente da Direcção da Comissão Vitivinícola Regional do Alentejo
- Eng^o Francisco Murteira – Diretor Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo
- Sr. Hernâni Ventura Capucho – Presidente da Direcção da Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

AS CASTAS ANCESTRAIS IBÉRICAS NA GÉNESE DA DIVERSIDADE VITÍCOLA DE PORTUGAL E DE ESPANHA

Jorge CUNHA^{1,2}; João BRAZÃO¹; Lalla H. ZINELABIDINE³; Margarida TEIXEIRA SANTOS¹; Pedro FEVEREIRO^{2,4}; José Miguel MARTINEZ ZAPATER³; Javier IBÁÑEZ³; José E. EIRASDIAS¹

RESUMO

A identificação e a preservação de castas na Coleção Ampelográfica Nacional têm permitido realizar estudos de diversidade e filogenia das castas de Portugal e a sua ligação ao germoplasma internacional, em particular com o de Espanha.

A genotipagem com 261 marcadores de polimorfismo de nucleótido único (single nucleotide polymorphisms – SNPs), foi fundamental para identificar castas ancestrais Ibéricas, tais como as

Alfrocheiro ou Bruñal, Cayetana Blanca ou Sarigo e Hebén ou Mourisco Branco.

Resultados já obtidos permitem inferir que estas castas ancestrais estão na origem e/ou apresentam graus de parentesco com inúmeras castas existentes apenas em Portugal e outras, ainda que em menor número, apenas existentes em Espanha. As castas Castelão, Moreto e Malvasia Fina são muito importantes para Portugal e representam mais de 12 500 ha de área cultivada. Em Espanha, as castas Xarello, Viúra, Airén, Cayetana Blanca e Pedro Ximenes representam mais de 300 000 ha do encepamento daquele País.

Este trabalho levamos a concluir que estes dois países tradicionalmente vitivinícolas apresentam uma origem comum para muitas castas que ao longo dos anos se diferenciaram pelas diferentes regiões de Portugal e de Espanha, formando um património genético Ibérico único e acrescentando uma grande quantidade de castas ao pool genético mundial.

Palavras chave: *Vitis vinifera L.*; castas ancestrais; SNPs; Portugal; Espanha.

1 – INTRODUÇÃO

A *Vitis vinifera L. subsp. vinifera* é a cultura que ocupa maior superfície cultivada em todo o mundo (FAO 2013). A sua cultura na Península Ibérica (Vale do Tejo e Sado) parece remontar a 2 000 anos a.C. (<http://www.ivv.minagricultura.pt/np4/91.html>) e tem evoluído de acordo com as preferências do consumidor. No passado, a cultura da vinha foi um misto de plantas (variedades) com diferentes características morfológicas:

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal. (jorge.cunha@iniav.pt).

² Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Portugal.

³ Instituto de Ciências de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Espanha.

⁴ Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Portugal.

bagos pequenos e grandes, brancos, tintos e rosados e, sobretudo, tolerantes às principais doenças criptogâmicas. Atualmente a vinha é orientada segundo a variedade, características de qualidade e rentabilidade económica.

Quer em Portugal, quer em Espanha, a atual superfície agrícola cultivada (240 000 ha e 1 000 000 ha, respetivamente) é ocupada por um número reduzido de variedades. Muitas outras variedades, as chamadas variedades minoritárias, permanecem apenas em coleções ampelográficas e de preservação do germoplasma, como em Portugal, no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), localizado em Dois Portos, e em Espanha, em Alcalá de Henares, no Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario e Alimentario (IMIDRA). Este estudo foi dirigido às castas ibéricas e mediterrânicas ancestrais das castas minoritárias autóctones locais, de forma a criar uma imagem de marca da história evolutiva da videira em cada um dos dois países da Península Ibérica.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material vegetal

As amostras das castas estudadas neste trabalho são predominantemente provenientes de Portugal e de Espanha.

Em Portugal, foram colhidas 288 amostras na Coleção Ampelográfica Nacional (PRT051) do INIAV, localizada em Dois Portos, na ex-Estação Vitivinícola Nacional.

As amostras das variedades de Espanha foram colhidas nas coleções de videira do Instituto de Ciências de la Vid y del Vino (ICVV), do Governo de La Rioja, em La Grajera (ESP217), e do IMIDRA (ESP080), em Alcalá de Henares.

Como possíveis progenitores, foram utilizados 1120 genótipos não redundantes (dados não apresentados), dos quais 263 são genótipos portugueses, incluindo plantas silvestres.

2.2 – Análise de ADN

O ácido desoxirribonucleico (ADN) foi extraído a partir de folhas jovens congeladas, utilizando o método descrito por CUNHA *et al.* (2010). As variedades estudadas foram genotipadas no Cento Nacional de Genotipagem de Espanha (CEGEN, www.cegen.es) para marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNPs) previamente identificados por CABEZAS *et al.* (2011) e segundo ZINELABIDINE *et al.* (2012).

2.3 – 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). Para cada um dos parentescos encontrados (trios e duos) foi calculado o LOD *score* (fiabilidade dos cruzamentos/parentescos encontrados). Foram considerados trios (dois progenitores e descendente)

os cruzamentos que apresentaram no máximo 3 alelos incompatíveis e duos (um progenitor e descendente) os que apresentaram no máximo 2 alelos incompatíveis.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Identidade das variedades

A análise conjunta das castas de Portugal e de Espanha permitiu confirmar sinónimos previamente identificados por características morfológicas e análise de ADN, utilizando microsatélites (SSRs) ou SNPs. No Quadro 1 faz-se a ligação entre a identidade das castas em estudo amostradas em Portugal com as de Espanha e subsequente confirmação com a base de dados internacional do Vitis International Variety Catalogue (VIVC, <http://www.vivc.de/>). As restantes castas são apresentadas nos Quadros 2 e 3 e são designadas pelo nome reconhecido no seu país de origem.

Quadro 1 Sinonímias identificadas nas castas em estudo

Identidade em Portugal	Identidade em Espanha	Nome principal VIVC
Alfrocheiro	Bruñal	Alfrocheiro
Arjunção	Listán Prieto	Listan Prieto
Bastardo	Maturana Tinta	Trousseau Noir
Diagalves	Mantúo	Mantuo
Espadeiro Mole	Ferrón	Manseng Noir
Ferral	Teta de Vaca	Ahmeur Bou Ahmeur
Jaen	Mencia	Mencia
Malvasia Cândida	Malvasía de Aromática	Malvasia di Sardegna
Moscatel de Alexandria	Moscatel de Alejandria	Muscat of Alexandria
Mourisco Branco	Hebén	Heben
Negra Mole	Mollar Cano	Mollar Cano
Roal	Rocía	Roal
Sarigo	Cayetana Blanca	Cayetana Blanca
Síria	Cigüente	Síria
Tinta Gorda	Mouratón	Mouraton
Tinta Miúda	Graciano	Graciano

3.2 – Relação genética entre as castas

A análise conjunta das castas de Portugal e de Espanha permitiu identificar um elevado número de castas que apresentam graus de parentesco entre si (resultados não apresentados). Os parentescos identificados (trios e duos) são claramente confirmados pelos valores de LOD *score* obtidos e pelo baixo número de alelos incompatíveis, três alelos no máximo para os trios identificados e dois alelos no máximo para duos identificados (Quadros 2 e 3).

Quadro 2 – Trios que envolvem as variedades Alfrocheiro, Cayetana Blanca e Hebén.

Progenitor 1	Progenitor 2	Descendente	Nº SNP (inc.)	Valor LOD	Ref. ^{a)}
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Tinta Gorda	247 (2)	78,7	4)
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Cornifesto	240 (0)	70,3	3); 4)
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Camarate Tinto	239 (0)	79,0	3); 4)
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Castelão	250 (0)	86,4	3); 4)
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Malvasia Preta	248 (0)	88,2	3); 4)
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Casteloa	211 (0)	71,0	
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Casculho	212 (1)	69,0	
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Castelã	209 (1)	76,7	
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Jampal	218 (0)	76,4	
Alfrocheiro	Cayetana Blanca	Moreto	247 (0)	71,3	3)
Alfrocheiro	Airén	Parreira Matias	211 (0)	75,7	
Alfrocheiro	Amaral	Douradinha	214 (3)	51,4	3)
Alfrocheiro	Patorra	Jaen	249 (1)	64,7	
Alfrocheiro	Ramisco	Concieira	214 (3)	54,9	
Alfrocheiro	Tinto Cão	Malvarisco	202 (2)	57,7	
Alfrocheiro	Hebén	Allarén	241 (0)	78,6	
Alfrocheiro	Hebén	Castelão Branco	220 (0)	71,5	
Alfrocheiro	Hebén	Malvasia Fina	252 (3)	70,9	3)
Alfrocheiro	Hebén	Tinta Grossa	222 (0)	74,7	3)
Alfrocheiro	Hebén	Trincadeira das Pratas	245 (0)	79,9	
Hebén	Amaral	Malvasia	221 (0)	74,5	1); 3)
Hebén	Arjunção	Verdejo de Salamanca	238 (0)	95,3	
Hebén	Bastardo	Trincadeira Branca	209 (0)	64,6	
Hebén	Bou Qsob	Diagalves	253 (1)	94,4	
Hebén	Brustiano Faux	Viúra	241 (1)	78,8	2); 3)
Hebén	Brustiano Faux	Xarello	239 (1)	80,3	3)
Hebén	Ferral	Larião	192 (2)	70,2	
Hebén	Folgasão	Roupeiro Branco	215 (2)	53,2	
Hebén	Malvasia Cândida	Malvasia Babosa	250 (0)	70,5	
Hebén	Malvasia Fina	Boal Espinho	212 (2)	83,9	
Hebén	Manseng Noir	Señá	238 (0)	79,9	
Hebén	Monastrell	Cot de Cheragas	241 (0)	87,5	3)
Hebén	Moscatel de Alexandria	Moscatel de Angüés	240 (0)	80,8	
Hebén	Moscatel de Alexandria	Moscatel Nunes	215 (1)	73,4	
Hebén	Rabigato	Códega do Larinho	214 (1)	70,6	

Hebén	Rabigato	Rabigato Moreno	213 (0)	82,1	
Hebén	Tinta Miúda	Mandón	240 (2)	76,4	2); 3)
Hebén	Vinhão	Padeiro	216 (1)	66,3	3)

a) Trios previamente identificados por: 1) LACOMBE *et al.* (2007); 2) GARCÍA MUÑOZ *et al.* (2011); 3) LACOMBE *et al.* (2013); 4) ZINELABIDINE *et al.* (2012). 1), 2) e 3) utilizaram SSRs e 4) utilizaram SNPs.

Quadro 3 – Duos que envolvem as variedades Alfrocheiro, Cayetana Blanca e Hebén.

Duos identificados		Nº SNP (incomp.)	Valor LOD	Ref. a)
Alfrocheiro	Branda	204 (1)	16,7	
Alfrocheiro	Monvedro	192 (1)	21,8	
Alfrocheiro	Monvedro de Sines	205 (1)	17,8	
Alfrocheiro	Tinta Pomar	205 (1)	18,3	
Alfrocheiro	Savagnin o Traminer	241 (0)	20,2	
Cayetana Blanca	Antão Vaz	212 (1)	18,0	4)
Cayetana Blanca	Castillo de Arcos	242 (2)	43,1	4)
Cayetana Blanca	Siria	245 (0)	34,2	4)
Cayetana Blanca	Garrido Macho	248 (0)	37,5	4)
Cayetana Blanca	Plateado	248 (0)	38,7	4)
Cayetana Blanca	Puerto Alto	200 (0)	34,1	4)
Cayetana Blanca	Rabo de ovelha	249 (0)	35,7	4)
Cayetana Blanca	Roal	249 (1)	44,3	4)
Hében	Airén	241 (1)	34,1	3)
Hében	Alarije	235 (0)	30,9	1); 3)
Hében	Albillo de Granada	202 (0)	28,8	
Hében	Almafra	215 (1)	15,3	
Hében	Beba	246 (0)	41,7	
Hében	Castillo de Arcos	241 (1)	27,8	
Hében	Cayetana	245 (0)	24,5	
Hében	Corazón de Cabrito	240 (1)	30,2	
Hében	Derechero de	239 (1)	23,4	
Hében	Eperó de Gall	237 (1)	20,3	3)
Hében	Ferral	233 (1)	33,4	
Hében	Forcallat	201 (0)	31,0	3)
Hében	Tinta Fumat	237 (1)	28,3	
Hében	Gorgollasa	240 (0)	25,4	2); 3)
Hében	Gouveio Real	215 (0)	21,9	
Hében	Jeronimo	225 (0)	32,9	3)
Hében	Lourela	214 (0)	17,7	
Hében	Malvar	234 (0)	37,3	3)
Hében	Malvasía Común	239 (1)	20,6	
Hében	Merseguera	244 (1)	30,6	3)
Hében	Miguel de Arco	235 (1)	24,9	3)
Hében	Molinera	230 (0)	32,9	
Hében	Moll	239 (0)	29,2	
Hében	Negra Mole	250 (1)	20,9	

Hében	Naparo	221 (0)	28,6	
Hében	Pedro Ximenes	249 (0)	31,9	3); 5)
Hében	Perrum	211 (1)	26,1	3)
Hében	Planta Fina	214 (0)	35,4	
Hében	Quigat	244 (0)	30,7	3)
Hében	Síria	237 (1)	20,4	3)
Hében	Sumoll	237 (0)	37,3	3)
Hében	Tarragoní	243 (0)	33,6	3)
Hében	Torralba	223 (1)	27,2	
Hében	Trepat	238 (0)	31,8	3)
Hében	Turruntés	221 (1)	26,4	
Hében	Verdil	229 (0)	25,0	
Hében	Vijiriega Común	244 (0)	26,6	3)

a) Duos previamente identificados por: 1) LACOMBE *et al.* (2007); 2) GARCÍAMUÑOZ *et al.* (2011); 3) LACOMBE *et al.* (2013); 4) ZINELABIDINE *et al.* (2012); 5) VARGAS *et al.* (2007). 1), 2), 3) e 5) utilizaram SSRs e 4) utilizaram SNPs.

Alguns dos trios e duos encontrados neste estudo foram anteriormente identificados por outros autores utilizando SSRs e SNPs (Quadro 2). Entre os progenitores identificados predominam as variedades Alfrocheiro ou Bruñal, Cayetana Blanca ou Sarigo e Hebén ou Mourisco Branco (Quadros 1, 2 e 3).

A casta Alfrocheiro está envolvida em 20 trios como progenitor 1, sendo os progenitores 2 a Cayetana Blanca, em 10 deles, a Hebén em 5 e diferentes castas nos restantes 5 trios (Quadro 2).

Nos 10 trios em que os progenitores são a Alfrocheiro e a Cayetana Blanca, os descendentes encontrados são variedades portuguesas, com exceção da Tinta Gorda que é conhecida em Espanha como Mouraton e de onde se pressupõe ser originária, por esta apresentar uma considerável área cultivada. Dos cinco trios em que os progenitores são a Alfrocheiro e a Hebén, apenas a descendente Allarén é originária de Espanha e as restantes são de origem portuguesa (Quadro 2), sendo a Malvasia Fina a mais importante no atual encepamento, ocupando mais de 5 000 ha (BÖHM 2011). Os restantes 5 trios têm como segundos progenitores as castas Airén, Amaral, Patorra, Ramisco e Tinto Cão, que apresentam como descendentes as castas Parreira Matias, Douradinha, Jaen, Concieira e Malvarisco, respetivamente. Nestes trios, a casta Airén é nitidamente originária de Espanha e a bibliografia antiga não a refere como casta cultivada no encepamento Português. A casta Mencia, designada em Portugal por Jaen, é maioritariamente cultivada no norte e no noroeste da Espanha, sendo atribuída a sua origem à região de Bierzo (MARTINEZ *et al.* 2006).

A casta Hebén é identificada em Portugal como Mourisco Branco (Quadro 1), sendo o nome português referido pela primeira vez na obra de ALARTE, em 1712. Em 1900, em Portugal, era cultivada do Douro ao Algarve (MENEZES 1900), sendo que atualmente, na Península Ibérica, apenas existe em coleções de preservação de germoplasma.

A Hebén está envolvida em 23 trios como um dos progenitores, dos quais 5 trios, já referidos anteriormente, envolvem a Alfrocheiro como segundo progenitor.

Dos cruzamentos da Hebén com a Brustiano Faux, com a Moscatel de Alexandria e com a Rabigato foram identificados os descendentes Viúra e Xarello, Moscatel de Angüés e Moscatel Nunes e Códega do Larinho e Rabigato Moreno, respetivamente (Quadro 2). Dos restantes 12 trios que envolvem outras 12 distintas castas como progenitor 2, destacamos a casta Bou Qsob, originária de Marrocos, como progenitora da casta Diagalves (<http://www.vivc.de/>).

Para além dos trios identificados para cada uma das castas Alfrocheiro, Cayetana Blanca e Hebén também foram identificados diferentes duos (relação progenitor/descendente).

Com a casta Alfrocheiro foram identificados 5 duos, um dos quais com a casta Savagnin que segundo SCIENZA *et al.* (1990) é considerada uma casta bastante antiga indiciando ser um dos progenitores da Alfrocheiro. Com a casta Cayetana Blanca, em Portugal designada por Sarigo, cuja origem geográfica é a região fronteiriça entre Portugal e Espanha (ZINELABIDINE *et al.* 2012) foram identificados 8 duos, dos quais não se consegue antever quais os progenitores. Na bibliografia mais antiga a designação Sarigo não é mencionada (MENEZES 1900).

A maioria dos trios identificados nas castas Alfrocheiro, Cayetana Blanca e Hebén envolvem várias castas portuguesas, na sua grande maioria castas minoritárias, enquanto que a maioria dos duos identificados envolvem castas de Espanha, principalmente com a casta Hebén (Quadro 3). Assim, foi possível encontrar a chave genética de algumas das variedades autóctones mais importantes no encepamento da Península Ibérica. Para Portugal, as castas Castelão, Moreto e Malvasia Fina representam atualmente

12 500 ha de área cultivada. Em Espanha as castas Airén, Cayetana Blanca, Viúra, Xarello e Pedro Ximénez representam cerca de 300 000 ha de área cultivada.

4 – CONCLUSÃO

As castas Alfrocheiro ou Bruñal, Cayetana Blanca ou Sarigo e Hebén ou Mourisco Branco são identificadas como progenitoras de 38 castas existentes atualmente nas diferentes regiões vitivinícolas de Portugal e de Espanha. Para estas três castas, cujos progenitores são desconhecidos, foram identificadas 50 diferentes castas que apresentam uma relação de parentesco (progenitor/descendente).

Os dois países tradicionalmente vitivinícolas apresentam uma origem comum para muitas castas, que ao longo dos anos se diferenciaram pelas diferentes regiões de Portugal e Espanha, formando um património genético Ibérico único e acrescentando uma grande quantidade de castas ao *pool* genético mundial.

5 – AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por: IVV – Instituto da Vinha e do Vinho; Programa de Desenvolvimento Rural (PRODER Ação 2.2.3.1. PA 18621) e Projeto COST (Euro-

pean Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research) Action FA1003. Os autores agradecem ao IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) pela disponibilização de algumas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARTE V. (1712) Agricultura das vinhas, e tudo o que pertence a ellas, até perfeito recolhimento do vinho, e relação das suas virtudes, e da cêpa, vides, folhas e borras. *In: Deslandesiana*, O.R. (Ed.), Lisboa.
- BÖHM J. (2011) Atlas das castas da Península Ibérica. Historia, terroir, ampelografia, Dinalivro, Lisboa, pp. 319.
- CABEZAS J.A., IBAÑEZ J., LIJAVETZKY D., VÉLEZ D., BRAVO G., RODRÍGUEZ V., CARREÑO I., JERMAKOW A.M., CARREÑO J., RUIZGARCIA L., THOMAS M.R., MARTINEZZAPATER J.M. (2011) A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biology* 11, 153.
- CUNHA J., TEIXEIRASANTOS M., VELOSO M., CARNEIRO L., EIRASDIAS J., FEVEREIRO P. (2010) The Portuguese Vitis Vinifera L. Germplasm: Genetic Relations between Wild and Cultivated Vines. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 25, 2537.
- FAO (2013) – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (acedido em: 5/09/2015).
- GARCÍAMUÑOZ S., LACOMBE T., de ANDRÉS M.T., GAFORIO L., MUÑOZ ORGANERO G., LAUCOU V., CABELLO F. (2011) Grape varieties (Vitis vinifera L.) from the Balearic Islands: genetic characterization and relationship with Iberian Peninsula and Mediterranean Basin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59, 589605.
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 10991106.
- LACOMBE T., BOURSQUOT J.M., LAUCOU V., DECHESNE F., VARES D., THIS P. (2007) Relationships and genetic diversity within the accessions related to malvasia held in the Domaine de Vassal grape germplasm repository. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 124131.
- LACOMBE T., BOURSQUOT J.M., LAUCOU V., VECCHISTARAZ M., PÉROS J. P., THIS P. (2013) Largescale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (Vitis vinifera L.). *Theoretical and Applied Genetics* 126, 401414.
- MARTÍNEZ RODRÍGUEZ M.D.C., SANTIAGO BLANCO J.L., PÉREZ J.E., BOSO ALONSO S. (2006) The grapevine cultivar mencia (Vitis vinifera L.): Similarities and differences with respect to other well known international cultivars. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 40 (3): 121 132.
- MENEZES P. (1900) Apontamentos para o estudo da Ampelographia Portuguesa. Boletim da Direcção Geral de Agricultura. Ministério das Obras Publicas. Comercio e Industria, Imprensa Nacional, Lisboa.
- SCIENZA A., VILLA P., GIANAZZA E., MATTIV, F., VERSINI G. (1990) La caratterizzazione genetica del Traminer. In: Symposium Gewürztraminer = Simposio Traminer aromatico. Bolzano: Provincia autonoma di Bolzano. Assessorato all'agricoltura.: 2132.
- VARGASA.M., VELEZ M.D., de ANDRES M.T., LAUCOU V., LACOMBE T., BOURSQUOT J.-M., BORREGO J., IBANEZ J. (2007) Corinto bianco: a seedless mutant of Pedro Ximenes. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 540-543.

ZINELABIDINE L.H., HADDIOUI A., RODRIGUEZ V., CABELLO F., EIRAS-DIAS I.E., MARTINEZ-ZAPATER J.M., IBANEZ J. (2012) Identification by SNP analysis of a major role for Cayetana Blanca in the genetic network of Iberian Peninsula grapevine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 63, 121-126.

INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE E ALTERAÇÃO CLIMÁTICA NA FENOLOGIA DA VIDEIRA: CASO DE ESTUDO NA REGIÃO DE LISBOA

Aureliano C. MALHEIRO ⁽¹⁾; Helder FRAGA ⁽¹⁾; José EIRAS-DIAS ⁽¹⁾; José SILVESTRE⁽²⁾; José MOUTINHO-PEREIRA ⁽²⁾; João A. SANTOS ⁽¹⁾

Resumo

A fenologia da videira é particularmente sensível às condições meteorológicas e climáticas. Deste modo, as datas de ocorrência dos estados fenológicos e respetivos intervalos podem variar de acordo com a casta e o ano. Neste contexto e dentro dos diferentes elementos meteorológicos/climáticos destaca-se a temperatura do ar como potencial regressor no desenvolvimento de modelos estatísticos. Assim foram utilizadas as médias mensais deste elemento para modelar, por regressão linear multivariada, o abrolhamento, floração e pintor de diferentes castas (e.g. Castelão, Fernão-Pires) na Região Vinícola de Lisboa. A floração revelou ser particularmente sensível à temperatura de Março-Abril, que por sua vez influencia estados seguintes. Por outro lado, foram encontradas tendências negativas estatisticamente significativas na duração dos intervalos fenológicos no passado recente, indicador dos efeitos térmicos acumulados na fenologia. O encurtamento temporal dos intervalos e/ou antecipação dos estados fenológicos são ainda mais patentes fazendo uso de projeções climáticas futuras (RCP4.5/8.5), o que poderá acarretar desafios acrescidos para a vitivinicultura portuguesa.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, viticultura, modelação da videira, impactos do clima

INTRODUÇÃO

Os estudos sobre a influência da variabilidade e alteração climática na viticultura são particularmente relevantes, uma vez que a temperatura é um fator crítico no crescimento e desenvolvimento da videira (Santos *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2014, 2015), assim como na sua distribuição geográfica mundial (Malheiro *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2013). A título de exemplo, o conceito de tempo térmico (similar ao conceito de graus-dia) para que um estado fenológico ocorra é determinado pelo acumular de temperaturas médias do ar acima de um valor de temperatura base (Winkler, 1974).

⁽¹⁾ Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal, correio electrónico: amalheir@utad.pt; hfraga@utad.pt; moutinho@utad.pt; jsantos@utad.pt

⁽²⁾ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV, 2565-191 Dois Portos, Portugal, correio electrónico: eiras.dias@iniav.pt; jose.silvestre@iniav.pt

Os principais estados fenológicos são o abrolhamento, a floração, o pintor e a maturação. Enquanto durante o estado de repouso da videira é geralmente favorável condições de significativa precipitação (promovendo o armazenamento de água no solo), durante o período de maturação do bago (pintor-maturação), condições atmosféricas estáveis (associadas a ausência de precipitação) tendem a ser benéficas para um adequado equilíbrio entre os parâmetros do rendimento, em termos de produção, e qualidade do mosto/vinho (Santos *et al.*, 2011). Saliente-se que cada estado fenológico e a duração dos intervalos entre os mesmos diferem consoante a casta e estão comumente associados às condições climáticas (particularmente térmicas) locais (Lopes *et al.*, 2008; Garcia de Cortázar-Atauri *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2011).

O clima de Portugal apresenta uma forte variabilidade temporal e espacial, que tende a influenciar significativamente a fenologia da videira (Malheiro *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2014, 2015). Além disso, torna-se mais ainda de particular importância avaliar estas relações, de forma a promover a implementação de medidas de mitigação/adaptação adequadas às projetadas alterações climáticas. De facto, nesta temática os estudos têm geralmente relatado uma antecipação das datas de ocorrência dos estados fenológicos, intervalos mais curtos entre os estados e maturações em períodos mais quentes do ano, apontando-se o aumento da temperatura nos últimos anos, como justificação para estas mudanças (Jones e Davis 2000; Duchêne e Schneider, 2005; Bock *et al.*, 2011; Tomasi *et al.*, 2011). Deste modo, como resultado das alterações climáticas podem ocorrer a longo prazo mudanças na produtividade, qualidade do mosto/vinho, aptidão de castas para cada região e porventura mesmo na geografia das principais regiões vinícolas (Malheiro *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2013, 2014). Assim, o presente estudo pretendeu avaliar a influência da variabilidade e alteração climática, em particular da temperatura do ar, sobre a fenologia de castas de referência na Região Vinícola de Lisboa, que é a terceira região (depois do Douro e Alentejo) mais importante na produção total de vinho no país (IVV, 2014).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados de fenologia foram obtidos da Coleção Ampelográfica Nacional pertencente ao “Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária”, localizado em Dois Portos (39.0°N, 9.2°W, 110 m), na Região Vinícola de Lisboa. Assim, as datas de ocorrência do abrolhamento, floração e pintor da casta branca (Fernão-Pires) e tintas (Aragonez e Castelão) foram registadas durante o período 1990-2011, exceto para o Aragonez, para os quais não havia dados disponíveis para os primeiros quatro anos. Os estados fenológicos observados foram também utilizados para determinar a duração dos intervalos entre os estados fenológicos.

A fim de avaliar as relações entre a fenologia da videira e temperatura do ar foram utilizadas como variáveis independentes, em um modelo de regressão linear múltipla, os valores das temperaturas médias mensais (e multi-mensais) das máximas, mínimas e médias. Para tal foram selecionados apenas os preditores não inter-correlacionadas e que apresentaram correlações estatisticamente significativas com a fenologia.

Os modelos desenvolvidos foram ainda aplicados a projecções climáticas futuras, de acordo com os preditores definidos. As simulações climáticas são parte integrante do “Coupled Model Intercomparison Project” (CMIP5) e são forçadas por dois cenários futuros distintos - RCP4.5 e RCP8.5 para 2006-2100 (Kotlarski *et al.* 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do período em estudo verificou-se uma clara variabilidade inter-anual para os diferentes estados fenológicos, assim como para os intervalos entre os mesmos (dados não apresentados). Nas três castas (Aragonez, Castelão e Fernão-Pires) não foram encontradas tendências estatisticamente significativas para os três estados fenológicos, com excepção da Aragonez que exibiu uma tendência significativa de +1,1 dias/ano para o abrolhamento. No entanto, estes últimos resultados devem ser interpretados com precaução uma vez que a série de dados é mais pequena para esta casta e poderá ser substancialmente influenciada por valores extremos (como o ano de 2005 com o abrolhamento a 6 de Abril).

Relativamente aos intervalos entre estados fenológicos foram encontradas tendências significativamente negativas para as castas Aragonez e Castelão (Quadro 1). Interessantemente foi ainda encontrado uma tendência negativa estatisticamente significativa para o intervalo abrolhamento-maturação para a casta Fernão-Pires ($R^2 = 0,49$). Estes resultados evidenciam o efeito térmico acumulado ao longo dos diferentes anos.

As relações entre os estados fenológicos e as temperaturas mensais anteriores à ocorrência desses estados são apresentadas no Quadro 2. Note-se que estas temperaturas estão negativamente relacionadas com os estados fenológicos (coeficiente de regressão <0 , dados não apresentados), indicando que um aumento da temperatura pode antecipar o respetivo estado fenológico.

As temperaturas médias das mínimas de Janeiro-Fevereiro-Março (Aragonez e Castelão) e Fevereiro-Março (Fernão-Pires) foram o principal preditor para o abrolhamento 2 ($0,46 \leq RCV \leq 0,69$, coeficiente de determinação com validação cruzada), com o Castelão evidenciando a resposta mais clara. A floração apresentou geralmente os coeficientes de 2 determinação mais elevados com a temperatura ($0,75 \leq RCV \leq 0,79$), sendo agora as médias das máximas em Março-Abril os preditores selecionados. As temperaturas de Março-Abril (média/mínima) são também determinantes para o pintor, explicando o modelo 57-87% da variância total para este estado fenológico, que apresenta um maior número de preditores comparativamente aos estados anteriores. Estes resultados podem ser atribuídos à influência de fatores não climáticos (e.g. práticas culturais) ao longo do ciclo da cultura. Estes resultados estão de acordo com outros estudos para outras regiões europeias, como os relatados para a Alsácia, França (Duchêne e Schneider 2005), Baixa Francónia, Alemanha (Bock *et al.*, 2011) e região de Veneza, Itália (Tomasi *et al.*, 2011).

QUADRO 1 – Características da tendência linear (coeficiente de determinação: R², valor de p e tendência anual) para a duração dos intervalos entre estados fenológicos de três castas em Dois Portos (1990-2011). ns: não significativo.

Intervalo	Casta	R ² (dias/ano)	Valor de p	Tendência
Abrolham. a Pintor	Aragonez	0,45	0.003	-1,5
	Castelão	0,21	0.035	-0,7
	Fernão-Pires	ns		
Floração a Pintor	Aragonez	0,67	<0,001	-0,9
	Castelão	0,40	0,002	-0,5
	Fernão-Pires	ns		

As projeções dos cenários de alterações climáticas aplicadas aos modelos selecionados indicam que o aquecimento futuro dará lugar à antecipação dos estados fenológicos e duração de intervalos mais pequenos. Estes resultados sugerem ainda que o pintor deverá ser o estado fenológico mais afectado, ocorrendo cerca de 2 semanas mais cedo (Figura 1). A ocorrência precoce destes estados fenológicos podem conjuntamente reduzir substancialmente a duração do ciclo vegetativo da videira.

QUADRO 2 - Resumo das variáveis de temperatura mensal (e multi-mensal) não inter-correlacionadas e que apresentaram correlações estatisticamente significativas e correspondentes coeficientes de determinação com validação cruzada (R²) para o abrolhamento, floração e pintor para três castas em Dois Portos (1990-2011).

TN: temperatura mínima, TG: temperatura média, TX: temperatura máxima.

	Abrolhamento	Floração	Pintor
	Preditor R _{cv} ²	Preditor R _{cv} ²	Preditor R _{cv} ²
Aragonez	TN _{Jan-Fev-Mar} 0,46	TX _{Mar-Abr} 0,75	TG _{Mar-Abr} 0,57
Castelão	TN _{Jan-Fev-Mar} 0,69	TX _{Mar-Abr} 0,78	TG _{Mar-Abr} TN _{Jun} TX _{Jul} 0,87
Fernão-Pires	TN _{Fev-Mar} 0,63	TX _{Mar-Abr} 0,79	TN _{Mar-Abr} TN _{Jul} 0,68

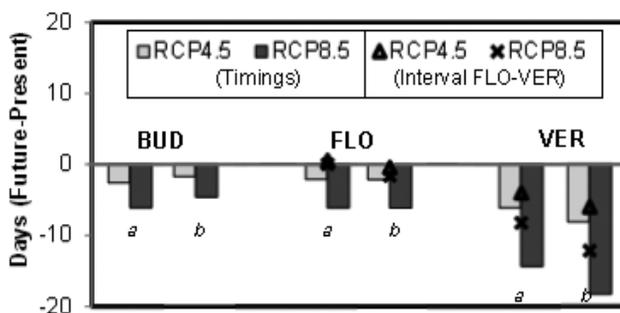


Figura 1 - Diferença (Futuro - Presente: 2040–2070 menos 1990–2011) entre o número de dias para a ocorrência do abrolhamento (BUD), floração (FLO) e pintor (VER) para as castas a) Fernão-Pires e b) Castelão.

CONCLUSÕES

O presente estudo evidencia a existência de uma relação estreita entre a fenologia da videira e a temperaturas do ar, particularmente para a floração, sendo as temperaturas de Março-Abril os preditores para este estado fenológico. Apesar destas temperaturas influenciarem também o pintor e a maturação, factores não climáticos (por exemplo, práticas culturais) são cada vez mais determinantes no decorrer do ciclo da cultura, explicando os menores valores de coeficiente de determinação e/ou maior número de preditores na modelação destes estados.

Além disso foram igualmente analisadas as tendências temporais na fenologia. Enquanto não foram geralmente encontradas tendências significativas para as datas dos estados fenológicos, várias tendências significativamente negativas foram determinadas para os intervalos fenológicos, indicativo do efeito térmico acumulado ao longo dos diferentes anos. Neste sentido a antecipação dos estados fenológicos e o encurtamento temporal dos seus intervalos foram patentes, fazendo uso de projeções climáticas futuras (RCP4.5/8.5), o que poderá acarretar desafios acrescidos para a vitivinicultura portuguesa.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo desenvolveu-se no âmbito do projeto PTDC/AGR-ALI/110877/2009 (ClimVineSafe - Estratégias de curto prazo para mitigação das alterações climáticas na viticultura mediterrânica), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). Este estudo foi também suportado por Fundos da União Europeia (FEDER/COMPETE) e nacionais (FCT) - projeto FCOMP-01-0124-FEDER-022692.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bock, A., Sparks, T., Estrella, N. e Menzel A. 2011. Changes in the phenology and composition of wine from Franconia, Germany. *Clim. Res.* 50:69-81.
- Duchêne, E. e Schneider, C. 2005. Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Agron. Sustain. Dev.* 25:93-99.
- Fraga, H., Malheiro, A.C., Moutinho-Pereira, J. e Santos, J.A. 2013. Future scenarios for viticultural zoning in Europe: ensemble projections and uncertainties. *Int. J. Biometeorol.* 57:909-925.
- Fraga, H., Malheiro, A.C., Moutinho-Pereira, J., Jones, G.V., Alves, F., Pinto, J.G. e Santos, J.A. 2014. Very high resolution bioclimatic zoning of Portuguese wine regions: present and future scenarios. *Reg. Environ. Change* 14:295-306.
- Fraga, H., Santos, J.A., Moutinho-Pereira, J., Carlos, C., Silvestre, J., Eiras-Dias, J., Mota, T. e Malheiro, A.C. 2015. Statistical modelling of grapevine phenology in Portuguese wine regions: observed trends and climate change projections. *The Journal of Agricultural Science* 1: 1-17.
- García de Cortázar-Atauri, I., Brisson, N. e Gaudilliere, J.P. 2009. Performance of several models for predicting budburst date of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Int. J. Biometeorol.* 53:317-326.
- IVV, 2014. Vinhos e Aguardentes de Portugal, Anuário 2014. Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., Lisboa.
- Jones, G.V. e Davis, R.E. 2000. Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:249-261.
- Kotlarski, S., Keuler, K., Christensen, O. B., Colette, A. *et al.* 2014. Regional climate modeling on European scales: a joint standard evaluation of the EURO-CORDEX RCM ensemble. *Geoscientific Model Development* 7: 1297-1333.
- Lopes, J., Eiras-Dias, J.E., Abreu, F., Climaco, P., Cunha, J.P. e Silvestre J. 2008. Thermal requirements, duration and precocity of phenological stages of grapevine cultivars of the Portuguese collection. *Ciência Téc. Vitiv.* 23:61-71.
- Malheiro, A.C., Santos J.A., Fraga, H. e Pinto, J.G. 2010. Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim. Res.* 43: 163-177.
- Malheiro, A.C., Campos, R., Fraga, H., Eiras-Dias, J., Silvestre, J. e Santos J.A. 2013. Winegrape phenology and temperature relationships in the Lisbon Wine Region, Portugal. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 47:287-299.
- Parker, A.K., García de Cortazar Atauri, I., van Leeuwen, C. e Chuine, I. 2011. General phenological model to characterise the timing of flowering and veraison of *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17:206-216.
- Santos, J.A., Malheiro, A.C., Karremann, M.K. e Pinto J.G. 2011. Statistical modelling of grapevine yield in the Port Wine region under present and future climate conditions. *Int. J. Biometeorol.* 55:119-131.
- Tomasi, D., Jones, G.V., Giust, M., Lovat, L., e Gaiotti, F. 2011. Grapevine phenology and climate change: relationships and trends in the Veneto Region of Italy for 1964-2009. *Am. J. Enol. Vitic.* 62:329-339.
- Winkler, A.J. 1974. General viticulture. University of California Press, USA.

QUANTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE INTRAVARIETAL DA INTERAÇÃO GENÓTIPO×ANO E SUA REPERCUSSÃO NA EFICÁCIA DA SELEÇÃO CLONAL

Elsa GONÇALVES¹; Antero MARTINS²

RESUMO

A avaliação da interação genótipo×ambiente (G×E) é essencial para efeito da seleção de clones de videira, mas defrontase com a contrariedade de exigir dois ciclos experimentais de seleção, sendo o segundo constituído por vários ensaios de adaptação regional, demorados e de custos elevados. No entanto, a parte dessa interação correspondente ao ano é passível de ser avaliada no ensaio inicial de seleção, pelo que o desenvolvimento de novas metodologias com vista à quantificação da variabilidade intravarietal da interação genótipo×ano (G×Y) nesta fase afigura-se de elevado interesse. A abordagem teórica para este estudo passa pelo ajustamento de modelos mistos. A metodologia proposta é exemplificada para várias castas, demonstrandose que relativamente ao rendimento estas diferem, não só na variabilidade genética, como também na variabilidade da interação G×Y. Em termos práticos, esta nova abordagem permite avaliar, logo numa fase inicial de seleção, a diferença de sensibilidade que os genótipos da casta têm relativamente à interação G×E, permitindo uma seleção imediata e um melhor planeamento do segundo ciclo experimental conducente à seleção clonal.

Palavras chave: videira, seleção massal genotípica, interacção genótipo × ambiente

1 – INTRODUÇÃO

Quando se cultivam clones de videira a interação genótipo×ambiente (G×E) é um fenómeno muito perturbador, isto é, alguns clones tendem a ter um comportamento não correspondente ao esperado, face ao valor objetivo do ambiente onde se encontram.

¹ Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, LEAF, Tapada da Ajuda, 1349 017 Lisboa; elsagoncalves@isa.ulisboa.pt; anteromart@isa.ulisboa.pt

² Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira (PORVID), Tapada da Ajuda, 1349017 Lisboa

No entanto, nos contextos vitícolas modernos assiste-se a um forte predomínio da cultura de clones e, face à imprevisibilidade de condições a que estes estão sujeitos, a sua seleção terá que basearse necessariamente no estudo exaustivo da interação $G \times E$. Mas, este estudo defrontase com a contrariedade de exigir dois ciclos experimentais de seleção, sendo o segundo constituído por vários ensaios de adaptação regional. No seu todo, tratase de um processo demorado e de custos elevados.

No mundo vitícola os estudos sobre interação $G \times E$ em clones de videira são escassos. Em Portugal, esta interação tem sido estudada através de várias técnicas de interpretação do fenómeno passíveis de serem utilizadas numa fase final de seleção de clones: representação gráfica da ordenação dos clones quanto a diferentes características nos diversos ambientes, coeficiente de variação dos valores observados de um genótipo nos distintos ambientes, análise de regressão dos valores observados de um genótipo sobre os índices ambientais e construção de *GGE Biplots* (Martins *et al.*, 1998a; Martins *et al.*, 1998b; Martins *et al.* 2004; Gonçalves e Martins, 2013; Martins e Gonçalves, 2015). Nas fases iniciais de seleção o fenómeno da interação é menos estudado, no entanto, têm sido propostas abordagens também aplicáveis a esse contexto e fortemente alicerçadas na teoria da genética quantitativa. Nestes casos, a interação $G \times E$ é estudada a partir da correlação genética entre ambientes (Gonçalves e Martins, 2014; Gonçalves *et al.*, 2016), seguindo-se a construção de um biplot com base nos melhores preditores empíricos lineares não enviesados dos efeitos genotípicos dos clones nos diversos ambientes (Gonçalves e Martins, 2014).

Apesar de todos estes esforços, outras abordagens devem ser desenvolvidas, contribuindo todas elas para uma melhor compreensão e interpretação do fenómeno da interação $G \times E$. Ora, em fases iniciais de seleção, quando as avaliações são feitas apenas num único grande ensaio, a parte da interação $G \times E$ correspondente ao ano é passível de ser avaliada e constitui uma parte da interação com grande interesse, já que tem uma componente de imprevisibilidade muito forte. Neste sentido, o desenvolvimento de novas metodologias com vista à quantificação da variabilidade intravarietal da interação genótipo \times ano ($G \times Y$) nesta fase afigura-se de elevado interesse prático: permite avaliar se uma casta apresenta sensibilidade à parte da interação $G \times E$ mais difícil de prever e, com isso, seleccionar para o segundo ciclo experimental clones com menor sensibilidade a esta parte da interação.

O objetivo deste trabalho é introduzir no primeiro ciclo experimental de seleção a quantificação da variabilidade intravarietal da interação $G \times Y$, bem como o desenvolvimento de uma nova medida para avaliação comparada da interação $G \times Y$ entre genótipos.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados utilizados para exemplificação da metodologia de análise da variabilidade intravarietal da interação $G \times Y$ descrita seguidamente, respeitam ao rendimento de 14 castas e são provenientes de ensaios do primeiro ciclo experimental de seleção

da videira, designados por população experimental de clones (POP), que contém uma amostra representativa da variabilidade genética intravarietal da casta. Foram consideradas castas em que o número de anos de avaliações na POP foi igual ou superior a 5, procurando-se, assim, que estes constituam uma amostra representativa das variações anuais (Quadro 1).

Quadro 1 – Castas estudadas, local da população experimental de clones, delineamento experimental e anos de avaliação do rendimento

Casta	Local	Delineamento experimental Blocos casualizados completos (n° clones×n° repetições×n° plantas)	N° (Anos de Avaliação)
Amaral	Cabeceiras de Basto	137×2×3	8 (2003, 2004, 2005, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012)
Bical	Mealhada	240×5×3	5 (1991, 1992, 1993, 1995, 1996)
Borraçal	Arcos de Valdevez	199×3×3	7 (1991 a 1997)
Cercial	Anadia	50×4×3	7 (1999 a 2005)
Cerceal Branco	Alijó	50×5×3	7 (2007, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2015)
Espadeiro	Lousada	133×5×2	5 (2001 a 2005)
Malvasia	Sintra	27×4×3	9 (2004, 2005, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013)
Molar	Sintra	13×4×3	8 (2006 a 2013)
Ramisco	Sintra	52×4×3	8 (2006, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014)
Tinta Barroca	Vila Flor	67×5×4	6 (1991, 1996, 2001, 2002, 2004, 2005)
Tinta Miúda	Bombarral	100×4×4	8 (1993, 1994, 1995, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001)
Touriga Nacional	V.N. Fozcoa	197×5×4	14 (1989 a 2002)
Vinhão	Arcos de Valdevez	211×5×2	5 (1988, 1989, 1990, 1991, 1993)
Viosinho	Palmela	203×5×3	8 (1992, 1993, 1994, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000)

A abordagem teórica para o estudo da variabilidade intravarietal da interação $G \times Y$ e seleção de clones menos sensíveis a esta interação, baseouse no ajustamento do seguinte modelo linear misto:

$$(1)$$

onde μ designa o rendimento do clone j no ano i no bloco k , μ a média geral populacional, α_k o efeito do bloco, β_j o efeito genotípico do clone, γ_i o efeito do ano, δ_{ij} o efeito da interação do clone com o ano e ϵ_{ijk} o erro aleatório associado à observação, com $k = 1, \dots, s$, sendo s o número de blocos completos do ensaio, $j = 1, \dots, g$ o número de genótipos (clones) e $i = 1, \dots, a$ o número de anos de avaliação. A média geral populacional e os efeitos dos blocos consideram-se efeitos fixos e os efeitos como aleatórios, admitindo-se variáveis alea-

tórias normais independentes e identicamente distribuídas (i.i.d.), com valor esperado zero e variâncias σ^2 , σ^2 , σ^2 , respectivamente. Os erros aleatórios admitem-se variáveis aleatórias normais i.i.d., com valor esperado zero e variância σ^2 .

O ajustamento do modelo linear misto descrito anteriormente foi efetuado com o Software R, package ASRemlR (Butler *et al.*, 2007). Os parâmetros de variância envolvidos no modelo foram estimados pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) (Patterson e Thompson, 1971), usando o algoritmo de informação média. A existência de variabilidade genética intravarietal, de variabilidade anual e de variabilidade intravarietal da interação G×Y foi testada através de testes de razão de verossimilhanças restritas, considerando-se, respectivamente, as seguintes hipóteses: $H_0: \sigma^2_{G \times Y} = 0$; $H_0: \sigma^2_{G \times Y} = 0$; $H_0: \sigma^2_{G \times Y} = 0$. De acordo com Self e Liang (1987) e Stram e Lee (1994), ao testar uma única componente de variância, a distribuição assintótica da estatística do teste é uma mistura de distribuições qui-quadrado com 0 e 1 graus de liberdade.

Entre castas, a comparação das variabilidades genética, do ano e da interação G×Y foi feita, respectivamente, com base nos coeficientes de variação genotípico ($\sigma^2_{G \times Y}$), do ano (σ^2_{ano}) e da interação G×Y ($\sigma^2_{G \times Y}$).

Uma vez obtidas as matrizes de covariâncias estimadas e incorporando-as nas equações do modelo misto, obtiveram-se os melhores estimadores empíricos lineares não enviesados (EBLUES) dos efeitos fixos e os melhores preditores empíricos lineares não enviesados (EBLUPS) dos efeitos aleatórios do modelo (Henderson, 1975; Searle *et al.*, 1992): EBLUPS dos efeitos genotípicos, dos anos e das interações G×Y. Isto é, os EBLUPS dependem das componentes de variância estimadas. Por exemplo, quando a estimativa da variância $\sigma^2_{G \times Y}$ é zero, os EBLUPS dos respectivos efeitos serão todos zero; quando a estimativa da variância $\sigma^2_{G \times Y}$ é significativamente diferente de zero, nem os EBLUPS dos efeitos da interação são zero. Ou seja, neste último caso, a seleção deve ser feita com base nos EBLUPS dos efeitos genotípicos, mas não podendo esquecer os EBLUPS dos efeitos da interação. O desejável será selecionar os clones que revelarem EBLUPS dos efeitos da interação G×Y próximos de zero. Então, o próximo desafio passa por desenvolver uma medida baseada nos EBLUPS dos efeitos da interação G×Y que, de uma forma expedita, permita ordenar os clones relativamente à sensibilidade à interação.

Essa medida terá que sintetizar os resultados da interação de um clone. Ora, para cada clone têm-se tantos EBLUPS da interação quanto o número de anos avaliados. Desejando que esses EBLUPS sejam todos próximos de zero e sabendo que a média dos EBLUPS é tendencialmente zero, então a variância dos EBLUPS dos efeitos da interação ($\sigma^2_{G \times Y}$) de um clone será uma medida da sensibilidade desse clone à interação G×Y, sendo dada por:

Quanto menor o valor de $\sigma^2_{G \times Y}$, menor a sensibilidade do genótipo à interação G×Y. Calculando-se a $\sigma^2_{G \times Y}$ para todos os clones, a ordenação desses valores permitirá proceder à seleção dos genótipos menos sensíveis à interação.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à análise das variabilidades genotípica, do ano e da interação G×Y relativamente ao rendimento de várias castas constam do Quadro 2. Para todas as castas estudadas a variabilidade genotípica foi significativa ($p < 0,05$). Entre castas, o coeficiente de variação genotípico difere, resultado previsível face ao já conhecido de outros trabalhos realizados no âmbito da seleção de castas portuguesas (Martins, 2011; Martins e Gonçalves, 2015). É importante referir que em todos os casos a variabilidade associada ao ano foi significativa ($p < 0,05$), acompanhada, em geral, de um elevado, quando comparado com os valores observados para os e . Apenas nas castas Molar e Espadeiro, o coeficiente de variação genotípico foi superior ao coeficiente de variação do ano. No entanto, a variabilidade intravarietal da interação G×Y foi detetada apenas em algumas das castas estudadas. As castas que revelaram variabilidade intravarietal da interação G×Y significativa ($p < 0,05$) foram as Bical, Cercial, Tinta Miúda, Touriga Nacional, Vinhão e Viosinho. Isto significa que nem todos os seus génotipos respondem da mesma forma às mudanças anuais. Pelo contrário, nas castas Amaral, Borraçal, Cerceal Branco, Espadeiro, Malvasia, Molar, Ramisco e Tinta Barroca, a variabilidade intravarietal da interação G×Y não foi significativa ($p > 0,05$), indicando que, quando sujeitas aos diferentes efeitos dos anos, todos os seus génotipos responderam da mesma maneira (de uma forma paralela). Nestas últimas castas, a seleção do grupo superior para o segundo ciclo experimental deve basearse apenas nos EBLUPs dos efeitos genotípicos, enquanto que nas primeiras a seleção passará, não só pelos EBLUPs dos efeitos genotípicos, como também pelos EBLUPs dos efeitos da interação G×Y. Parece, portanto, evidente a vantagem deste tipo de análise: se uma casta manifesta variabilidade intravarietal da interação G×Y, então, logo no primeiro ciclo experimental de seleção, há matériaprima para selecionar para menor sensibilidade à interação G×Y.

Quadro 2 – Estimativas das variâncias do ano (σ^2_{ano}), genotípica (σ^2_{gen}) e da interação genótipo×ano ($\sigma^2_{ano \times gen}$), valor p (p) associado aos testes às respetivas componentes de variância e coeficientes de variação do ano (Cv_{ano}), genotípico (Cv_{gen}) e da interação G×Y (nas castas estudadas relativamente ao rendimento (kg/planta))

Casta	(p)	(%)	(p)	(%)	(p)	(%)
Amaral	1,839 (<0,001)	32,2	1,142 (<0,001)	25,4	0,000	0,0
Bical	2,214 (<0,001)	58,5	0,113 (<0,001)	13,3	0,068 (<0,001)	10,3
Borraçal	9,919 (<0,001)	75,3	0,631 (<0,001)	19,0	0,121 (0,062)	8,3
Cercial	0,801 (<0,001)	42,2	0,115 (<0,001)	16,0	0,031 (0,038)	8,3
Cerceal Branco	0,576 (<0,001)	27,8	0,205 (<0,001)	16,6	0,000	0,0
Espadeiro	2,533 (<0,001)	18,9	3,680 (<0,001)	22,8	0,000	0,0
Malvasia	0,765 (<0,001)	32,9	0,445 (<0,001)	25,1	0,000	0,0
Molar	0,141 (<0,001)	20,9	0,459 (<0,001)	37,7	0,000	0,0
Ramisco	0,755 (<0,001)	46,3	0,170 (<0,001)	22,0	0,000	0,0
Tinta Barroca	0,255 (<0,001)	33,4	0,092 (<0,001)	20,0	0,000	0,0
Tinta Miúda	1,096 (<0,001)	43,0	0,528 (<0,001)	29,8	0,138 (<0,001)	15,2

Touriga Nacional	0,114 (<0,001)	38,1	0,044 (<0,001)	23,7	0,013 (<0,001)	12,7
Vinhão	15,049 (<0,001)	73,1	0,843 (<0,001)	17,3	0,443 (<0,001)	12,5
Viosinho	1,673 (<0,001)	56,5	0,384 (<0,001)	27,1	0,106 (<0,001)	14,2

Rejeitase ; Rejeitase Rejeitase se $p < 0,05$.

O procedimento seguinte com vista à seleção passará por calcular a medida de sensibilidade à interação G×Y proposta na seção da metodologia, isto é, a variância dos EBLUPs dos efeitos da interação G×Y para cada clone e ordenar os valores obtidos, por exemplo, por ordem crescente, de modo a identificar, respetivamente, os clones com menor e maior sensibilidade à interação G×Y. No Quadro 3 encontram-se os valores mínimos e máximos encontrados para essa medida de sensibilidade à interação nas castas que revelaram interação G×Y significativa.

Quadro 3 – Variância dos EBLUPs dos efeitos da interação G×Y para o clone com menor sensibilidade à interação G×Y (min.) e para o clone com maior sensibilidade à interação G×Y (máx.) nas castas estudadas relativamente ao rendimento (kg/planta)

Castas	(min.)	(máx.)
Bical	0,0003	0,0856
Cercial	0,0004	0,0159
Tinta Miúda	0,0077	0,2911
Touriga Nacional	0,0005	0,0125
Vinhão	0,0013	0,6084
Viosinho	0,0032	0,1200

Verificase que os valores mínimos e máximos da variância dos EBLUPs dos efeitos da interação são muito diferentes. Estes resultados suportam a interpretação de que esta é uma medida que permite a diferenciação de clones menos e mais sensíveis à interação. De facto, os resultados constantes do Quadro 3 indicam que, no mínimo, a do clone com maior sensibilidade é cerca de 27 vezes superior à do clone com menor sensibilidade à interação (caso da casta Touriga Nacional) e, no máximo, a do clone com maior sensibilidade é cerca de 472 vezes superior à do clone com menor sensibilidade à interação (caso da casta Vinhão).

Não sendo possível visualizar o fenómeno da interação G×Y em todos os génotipos de todas as castas que apresentaram variabilidade intravarietal da interação, exemplificase apenas o caso da casta Viosinho e para os clones que exibiram maior e menor sensibilidade à interação G×Y (Figura 1). Na Figura 1A está representado o comportamento do clone com maior variância dos EBLUPs dos efeitos da interação G×Y, portanto, o mais sensível à interação G×Y. Este clone apresenta um EBLUP do efeito genotípico positivo, isto é, prevê-se que geneticamente produza mais 0,255kg que a média da casta. No entanto, os efeitos da interação desse clone com o ano são marcantes, sendo, por exemplo de 0,485kg no ano de 1994, de +0,558kg no ano de 1996, de +0,242kg no ano de 1997, de 0,365kg no ano de 2000, etc.. Daqui resulta que o rendimento previsto do clone ao longo dos anos não evolua de forma paralela com os efeitos dos anos. Pelo

contrário, o clone com menor variância dos EBLUPs dos efeitos da interação $G \times Y$, isto é, o clone com menor sensibilidade à interação $G \times Y$ (Figura 1B), revelou um EBLUP do efeito genotípico de +0,132kg e os efeitos da interação desse clone com os diversos anos foram sempre próximos de zero. Como consequência, o rendimento previsto desse clone ao longo dos anos evolui de uma forma mais paralela com os efeitos do ano. O mesmo tipo de comentário e de visualização será observado para as outras castas que revelaram variabilidade da interação $G \times Y$ significativa.

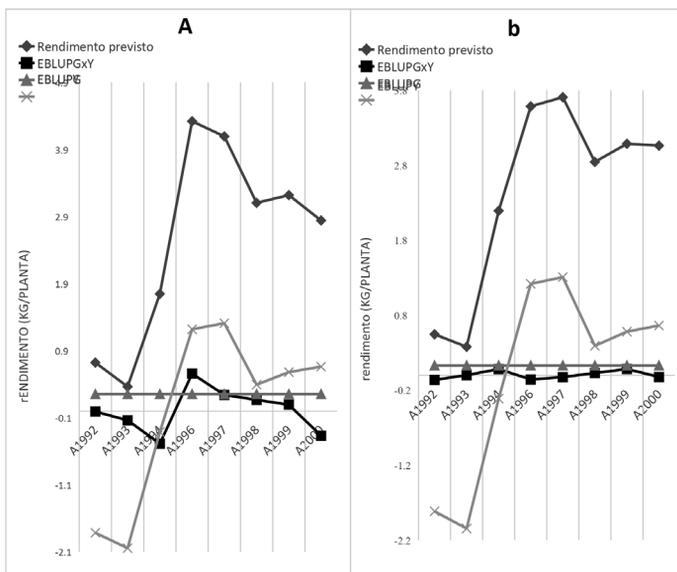


Figura 1 – visualização do rendimento (kg/planta) de acordo com o modelo ajustado ao EBLUP dos efeitos genotípico (EBLUPG), dos anos (EBLUPY) e das interações $G \times Y$ (EBLUPGY) para o clone mais sensível à interação $G \times Y$ (A) e para o clone menos sensível à interação $G \times Y$ (B) na casta Viosinho.

4 – CONCLUSÕES

A metodologia proposta permitiu quantificar a variabilidade intravarietal da interação $G \times Y$, tendo esta variado com a casta. Nas castas que revelaram variabilidade intravarietal da interação $G \times Y$, a variância dos EBLUPs dos efeitos da interação $G \times Y$ revelou-se uma medida adequada para a diferenciação de clones relativamente à sensibilidade à interação $G \times Y$.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da “Rede Nacional de Selecção da Videira”, pela sua contribuição na colheita de dados e na gestão corrente dos ensaios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Butler, D., Cullis, B.R., Gilmour, A.R, Gogel, B.J. (2007). *ASRemlR reference manual. AsRemlR: estimates variance components under a general linear mixed model by residual maximum likelihood (REML)*. NSW Department of Primary Industries, Queensland Government. Queensland. Gonçalves, E., Martins, A. (2013). Metodologias de estudo da interacção genótipo×ambiente na fase final da selecção clonal da videira. *Actas 9º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, 15-17 Maio, vol. 1:2334.
- Gonçalves, E., Martins, A. (2014). *Metodologias estatísticas para estudo da interacção genótipo×ambiente em clones de videira*. In Estatística: A ciência da incerteza. Actas XXI Congresso da Sociedade Portuguesa de Estatística, 89103.
- Gonçalves, E., Carrasquinho, I., Almeida, R., Pedroso, V., Martins, A. (2016). Genetic correlations in grapevine and their effects on selection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22:52–63.
- Henderson, C.R. (1975). Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31: 423447.
- Martins, A. (2011). *Seleção 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 pp205229. 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. 1:2329
- Martins, A., Carneiro, L., Mestre, S., Gonçalves, E., NevesMartins, J., Almeida, C., Ramadas, I., EirasDias, J.E., Madeira, D., Magalhães, N. (1998b). Facteurs d’instabilité du rendement de clones de vigne. In: *Actas XXIII Congrès Mondial de la Vigne et du Vin*. Lisboa, vol. 1:169174.
- Martins, A., Gonçalves, E. (2015). Grapevine breeding programmes in Portugal. In *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry: Traditional and Molecular Techniques*. A. G. Reynolds ed., Woodhead Publishing Elsevier, UK, 159182.
- Martins, A., Gonçalves, E., Carneiro L.C. (2004). Instabilidade do rendimento de clones de videira resultante da interacção genótipo×ambiente e estratégias experimentais para a sua redução. In: *Actas 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, vol. 1: 97102.
- Patterson, H.D., Thompson, R. (1971). Recovery of interblock information when block sizes are unequal. *Biometrika* 58: 545554.
- Searle, S.R., Casella, G., McCulloch, C.E. (1992). *Variance components*. John Wiley & Sons, New York.
- Self, S.G., Liang, K.Y. (1987). Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *J Am Stat Assoc* 82: 605610.
- Stram, D.O., Lee, J.W. (1994). Variance components testing in the longitudinal mixed effects model. *Biometrics* 50:11711177.
- The R Foundation (2015). R version 3.2.2. *The R Foundation for Statistical Computing*. <http://www.rproject.org>.

AMPHICERUS BIMACULATUS NA VINHA EM PALMELA, PORTUGAL: CONTRIBUIÇÕES PARA O ESTUDO DA SUA BIOECOLOGIA

Inês BENTO; Elsa Borges da SILVA¹, Ana Teresa Baptista CAVACO², António MEXIA³

Amphicerus bimaculatus (Olivier, 1790) é um coleóptero xilófago da família Bostrichidae. Na vinha, as galerias causadas por esta espécie podem resultar em prejuízos. Em Palmela, esta praga encontra -se presente. Foram testadas armadilhas de atração cromática e armadilhas de interseção e de funil Lindgren, tendo nestas duas últimas sido testadas as preferências pelos atrativos etanol e alfa-pineno, em 3 vinhas. Não foram capturados indivíduos através destes métodos, sugerindo que o período de amostragem, de abril a julho de 2015, não englobou o período de voo da espécie. Em paralelo, foram capturados indivíduos *A. bimaculatus* presentes no interior de sarmento que foram mantidos em laboratório, acompanhando-se os diferentes estados de desenvolvimento da espécie, o que permitiu levantar hipóteses acerca do número de gerações anuais desta espécie na região. Uma sub-amostra do total de indivíduos capturados participaram em ensaio na presença de videiras. Foram observados comportamentos de alimentação, exploração do habitat e sondagem do substrato com oviscapto em atitude de postura e obtiveram-se os primeiros registos de posturas efetuadas pelas fêmeas desta espécie. Realizou-se, ainda, um ensaio para apurar a preferência cromática de *A. bimaculatus* a curta distância de acordo com os sexos; não foram observadas diferenças significativas nas cores testadas, para as fêmeas, mas os machos evidenciaram uma preferência significativa pelo preto.

Palavras-chave: Bostrichidae, ciclo de vida, seleção hospedeiro, monitorização, prejuízos.

¹ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa

² AVIPE Associação de Viticultores do Concelho de Palmela, R. Dom João Castro, N° 12 2950-206 Palmela

³ Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa

Autor correspondente: ins.bento@gmail.com

1 - INTRODUÇÃO

Amphicerus bimaculatus (Olivier, 1790) (Coleoptera, Bostrichidae) (Fig. 1) é um coleóptero xilófago da família Bostrichidae. Ocupa vários hospedeiros vegetais, entre os quais a vinha, efetuando galerias e orifícios que podem, por sua vez, originar prejuízos, sendo por isso considerado praga (Fig. 2) (Bahillo *et al.*, 2007).

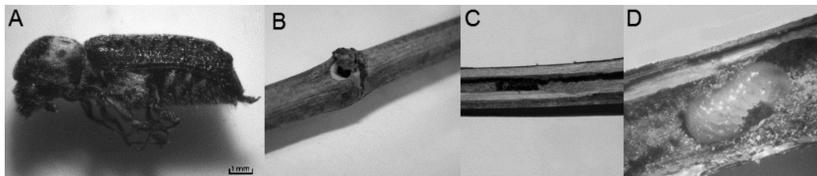


Figura 1. A) *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) em adulto; Estragos causados por *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) em videira: B) orifício de entrada na proximidade do nó, C) galeria de adulto, D) galeria de larva.

Em Palmela, esta espécie encontra-se presente, já há alguns anos, originando queixas por parte dos vicultores da região. Por este motivo, a Associação de Vitecultores do Concelho de Palmela (AVIPE), associação reconhecida para a prática de Proteção Integrada da Vinha, encontrava-se interessada no seu estudo. Este trabalho surgiu deste interesse, originando uma parceria entre a AVIPE e o Instituto Superior de Agronomia (ISA) da Universidade de Lisboa (ULisboa), no âmbito da realização de uma tese de mestrado.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Área de estudo

O estudo foi realizado em Palmela (Setúbal), em três vinhas sob o acompanhamento técnico da AVIPE: vinha Rui Lobo (Poceirão), Vinha Fernando Santana (Fonte da Barreira) e Vinha Vasco Machado (Fernando Pó), durante 2015. As videiras, pertencentes à casta Castelão, estão plantadas segundo compasso de 2,60mx1,10m e com sistema de condução *Royat* bilateral ascendente. Foram selecionadas unidades de amostragem com presença de *A. bimaculatus* no passado.

2.2 - Ação na videira e prejuízos

Procedeu-se a avaliação da intensidade de ataque da praga em três vinhas selecionadas. Para tal, foi escolhida uma amostra aleatória de cerca de 200 sarmentos/vinha, que foram observados na procura de orifícios circulares na proximidade dos nós e galerias, indicativos da ocupação de *A. bimaculatus*. Posteriormente, foram recolhidos, de 10-16/março, 106 sarmentos completos pertencentes à lenha de poda, de uma forma não aleatória, na medida em que apenas foram amostrados sarmentos que apresentas-

sem estragos (e.g. orifícios, galerias). Foi contabilizado o número total de orifícios, as ordens dos gomos com orifícios e o número de indivíduos de *A. bimaculatus* presentes nas galerias.

2.3- Amostragem da população de *Amphicerus bimaculatus*

Foi realizada captura direta de indivíduos de *A. bimaculatus* através da recolha de material de poda infestado; foram capturados adultos, larvas e pupas, transportados para o laboratório de Entomologia do ISA ($T=24-25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ h.r., fotoperíodo 14L:10E ± 1). O alimento fornecido foi grãos de pólen e algodão embebido em mel diluído (1:1). Para se garantir a identidade de *A. bimaculatus*, estes sarmentos foram isolados em caixas até se verificar a emergência dos adultos.

2.4 - Mecanismos de seleção do hospedeiro e reação a estímulos (ensaio com armadilhas em campo)

Para confirmar o agente biológico presente nas vinhas, foi delineado um ensaio com vista à captura da espécie, utilizando-se para tal vários tipos de armadilhas, numa tentativa de perceber quais as mais adequadas, na perspetiva da futura adaptação a armadilhas usadas para estimativa do risco ou como meio de proteção. Foi testada a preferência de *A. bimaculatus* pelas cores branca e preta, assim como a sua atração pelos voláteis etanol e alfa-pineno. Utilizaram-se armadilhas de material acrílico, 150x210mm e espessura 3mm, de cores preta, branca e transparente, cobertas com cola do tipo Napvis. A área ocupada pela cola foi de 150x150mm para permitir o manuseamento das placas. Em cada vinha instalaram-se duas armadilhas de intersecção transparentes com e sem atrativo (etanol) e quatro armadilhas de atração cromotrópicas, duas pretas e duas brancas, de acordo com a direção predominante do vento para cada vinha, a uma distância de 0,5m do solo. As armadilhas com etanol foram distanciadas entre si cerca de 100m, para não haver interferência entre as mesmas e as armadilhas coloridas distanciadas entre si cerca de 30m. A ordem das armadilhas no campo foi aleatória e alterada a cada semana. Foi ainda instalada na vinha Fernando Santana uma armadilha de funis Lindgren (*Lindgren funnel trap*) com o atrativo alfa-pineno. A captura de insetos decorreu durante 16 semanas, de 10/abril a 31/julho, inspecionando-se e limpando-se as armadilhas a cada semana.

2.5 - Mecanismos de seleção do hospedeiro e reação a estímulos (preferência cromática de *Amphicerus bimaculatus* a curta distância)

Foi utilizada uma caixa acrílica construída para o trabalho de Campos (2008) com 30cm de altura, composta por 8 compartimentos paralelepípedicos de 15cm de comprimento por 11,5cm de largura, equidistantes de uma área comum octogonal com 30cm de diâmetro. A arena foi iluminada verticalmente por uma lâmpada multivapores de iodetos metálicos, de 70W (Powerball HCI-T). As cores testadas foram o preto, o castanho, o verde e o vermelho, por esta ordem de posição (Fig. 3).

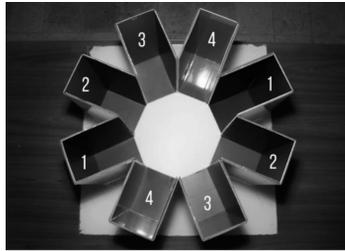


Figura 3. Caixa acrílica (dimensões das seções: 30x15x11,5cm e 30cm diâmetro da arena central) forrada com a sequência de cores escolhida (1-preto, 2-castanho, 3-verde, 4-vermelho) para o ensaio da preferência cromática de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) a curta distância.

Foram submetidos ao ensaio 76 indivíduos, 39 machos e 37 fêmeas. Cada indivíduo foi colocado no centro da caixa, aleatoriamente virado para qualquer um dos lados, cronometrando-se 20min a partir daí, tempo durante o qual se registavam todos os comportamentos observados, nomeadamente voos efetuados, seleção de cores por parte do sujeito e a duração de cada escolha. Apenas se considerou escolha por parte do sujeito quando o seu corpo entrava na totalidade dentro de uma das seções. A preferência da cor de acordo com o sexo foi submetida a teste de χ^2 , através do programa IBM SPSS statistics 22,0 para Windows (Inc. Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi $\alpha=0,05$.

2.6 - Estudo dos estados de desenvolvimento de *Amphicerus bimaculatus*

Para estudar a biologia da espécie e acompanhar o seu ciclo de vida no contexto da presença de hospedeiro, selecionaram-se 15 indivíduos, 4 machos e 11 fêmeas, que foram colocados na presença de videiras envasadas da casta Aragonez. Para tal utilizou-se uma caixa acrílica transparente de dimensões 40x21x67cm. O ensaio decorreu de 08/junho a 28/julho e foram feitas observações 3 vezes/dia. Devido ao tamanho reduzido dos ovos, que impossibilita a sua perceção a olho nu, as videiras foram observadas a microscópio estereoscópio (10-70X ampliação) (Meiji Techno, EMZ13TR) para procura de posturas.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Ação na videira e prejuízos

A avaliação da intensidade de ataque de *A. bimaculatus* nas vinhas em estudo encontra-se no Quadro 1. O número de orifícios por sarmento variou entre 1 e 7, sendo que a grande maioria dos sarmentos amostrados apresenta 1 ou 2 orifícios. Procedeu-se ao cálculo da distribuição de frequências dos orifícios ao longo do sarmento (Fig. 4).

Quadro 1. Avaliação da intensidade de ataque de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) para as três vinhas em estudo (Palmela, Setúbal): Rui Lobo/Poceirão (A), Fernando Santana/Fonte da Barreira (B), Vasco Machado/Fernando Pó (C).

Vinha	Nº varas observadas	Nº varas infestadas	% ataque
A	200	1	0,5
B	200	16	8
C	200	3	1,5

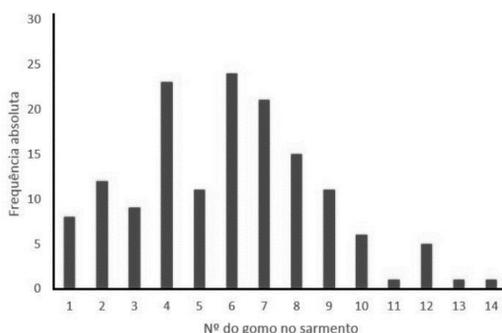


Figura 4. Distribuição de frequências dos orifícios ao longo do sarmento (1=gomo da coroa) realizados por *Amphicerus bimaculatus* (Olivier).

Nas vinhas estudadas, o tipo de poda utilizado é Royat bilateral ascendente, sendo deixados ca de 2 gomos à carga/talão, à poda. A frequência de ataque das 3 primeiras ordens (ordem da coroa mais os 2 primeiros nós) corresponde aproximadamente a 20%. Usando este valor e a estimativa de ataque preliminar calculado para as vinhas (Quadro 1) obtém-se a estimativa do prejuízo na ordem dos 0,1%, 1,6% e 0,3%, respetivamente para as vinhas A, B e C. Os estragos económicos mais significativos serão nas vinhas com condução Guyot, pois são deixados mais gomos na poda. A estimativa de prejuízo, por ser preliminar, deve ser analisada com alguma reserva.

3.2 - Mecanismos de seleção do hospedeiro e reação a estímulos (ensaio com armadilhas em campo)

No período de amostragem, não foram capturados indivíduos de *A. bimaculatus* em nenhuma das armadilhas testadas. Foram, no entanto, observados vários indivíduos adultos em voo no dia 01-04. O facto de não terem ocorrido capturas pode dever-se ao facto de os adultos não se encontrarem em período de voo durante o tempo do ensaio de campo, até porque foram visíveis adultos em voo antes da instalação das armadilhas. Seria interessante testar armadilhas mais cedo (antes de abril) e após agosto novamente.

A não ocorrência de capturas pode ainda ser explicada pelo facto de as armadilhas escolhidas não serem as mais adequadas para a espécie em estudo, sendo esta hipótese menos provável.

3.3 - Mecanismos de seleção do hospedeiro e reação a estímulos (preferência cromática de *Amphicerus bimaculatus* a curta distância)

Dos 76 indivíduos participantes no ensaio, 5 ofereceram respostas nulas (não efetuaram nenhuma escolha). O número de indivíduos considerados para a análise estatística foram 71 (35 machos e 36 fêmeas). No caso das fêmeas, não foram verificadas diferenças significativas para as cores testadas ($N=36$; $\chi^2_{23}=2,222$; $p=0,528$), sendo o preto a cor mais escolhida. Para os machos, verificaram-se diferenças significativas nas cores testadas ($N=35$; $\chi^2_{23}=26,829$; $p<0,001$), sendo o preto a cor significativamente mais escolhida (Fig. 5).

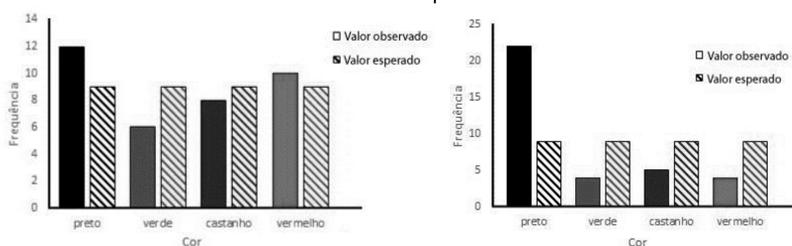


Figura 5. Ensaio para a preferência cromática de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) cujas cores testadas foram preto, verde, castanho e vermelho: resultados do teste de χ^2 para as fêmeas ($N=36$) à esquerda e para os machos ($N=35$) à direita.

O facto de não ter ocorrido resposta clara pelas fêmeas pode significar que os mecanismos de seleção do hospedeiro impliquem vários fatores, como mais que uma cor ou até outros estímulos, como atrativos químicos. As fêmeas fecundadas e em período de postura poderão ser mais ativas para sondar o hospedeiro com o objetivo de realizar posturas, mas nada garante que, à data do ensaio, estivessem todas fecundadas. Já os machos, após a fecundação das fêmeas, não têm necessidade de explorar o ambiente a não ser para alimentação. Nos machos, a análise estatística mostrou diferenças significativas nas cores testadas, sendo o preto a cor mais escolhida; Tal preferência poderá ser explicada pelo facto de o preto ser a cor mais semelhante ao abrigo conferido pelas galerias dos sarmentos.

3.4 - Estudo dos estados de desenvolvimento de *Amphicerus bimaculatus*

No ensaio em contexto da presença de hospedeiro, observou-se vários comportamentos, desde alimentação, exploração do habitat e sondagem do substrato para postura com o ovíscapto (Fig. 6). Foi registada atividade superior das fêmeas em relação à dos machos ao longo do dia. Os locais selecionados pelas fêmeas para as posturas foram as zonas junto aos nós dos sarmentos e de corte da videira. Não foi observado nenhum padrão de postura, sendo esta, por isso, aleatória (Fig. 7). Foi, igualmente, possível observar pupas e larvas nos sarmentos em campo (Fig. 8).



Figura 6. Pormenor do ovíscapto da fêmea de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) em atitude de postura.

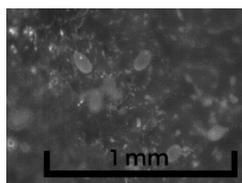


Figura 7. Ovos depositados por *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) em corte de videira.

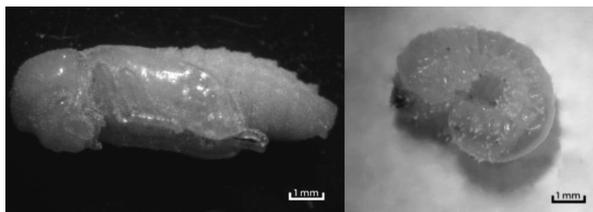
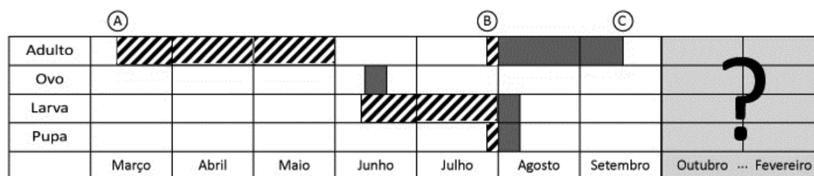


Figura 8. Pupa (à esquerda) e larva (à direita) de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) presente nos sarmentos recolhidos do campo nas vinhas estudadas (Palmela, Setúbal).

O estudo permitiu documentar os estados de ovo, larva e pupa, através das recolhas no campo e observação em laboratório, sendo possível esboçar a ocorrência sazonal de uma parte do ciclo de vida anual de *A. bimaculatus* (Quadro 2).

Mediante as observações realizadas, deve existir, pelo menos, uma geração anual de *A. bimaculatus* em Palmela. As galerias efetuadas nas videiras, causadas por larvas ou pelos adultos para alimentação e abrigo, são então detetáveis na altura da poda, explicando as queixas dos viticultores.

Quadro 2. Ocorrência sazonal de *Amphicerus bimaculatus* (Olivier) (a listado: campo; a liso: laboratório). Entre outubro e fevereiro, não há dados para suportar a ocorrência sazonal. A- início do trabalho de campo e laboratório. B- fim do trabalho de campo. C- fim do trabalho de laboratório.



4. CONCLUSÃO

Este estudo levou a diferentes conclusões acerca da bioecologia de *A. bimaculatus* que podem ter contributos proveitosos para a adoção de meios de proteção da vinha em relação a esta espécie. Nas vinhas em estudo (Palmela), a estimativa do prejuízo causado por esta espécie rondou os 0,1-1,6%. As diferentes armadilhas testadas em campo e o ensaio da preferência cromática de *A. bimaculatus* permitiram uma primeira abordagem aos mecanismos de seleção do hospedeiro a curta e longa distância. O estudo dos diferentes estados de desenvolvimento possibilitaram acompanhar os estados imaturos, obtendo vários registos fotográficos que auxiliam numa melhor identificação da praga em campo. Na região estudada, deve existir pelo menos uma geração anual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bahillo de la Puebla, P. e López-Colón, JI, 2001. Los Bostrichidae Latreille, 1802 de la Comunidad Autónoma Vasca y áreas limítrofes (Coleoptera). *Heteropter Revista de Entomología* 1: 25-40.
- Campos, LPMS, 2008. Efeito de factores de natureza visual na localização de fontes de feromona pelos machos de cochonilha algodão dos citrinos, *Planococcus citri* (Risso). Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrónómica, ISA/UTL, Lisboa.

CARATERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Phaeomoniella chlamydospora* OBTIDOS NA REGIÃO DEMARCADA DO DÃO.

Jorge SOFIA^{1,3*}; João TROVÃO^{1*}; António PORTUGAL¹; Hugo PAIVA DE CARVALHO¹; Nuno MESQUITA¹; Teresa NASCIMENTO²; Cecília REGO²; Maria Teresa GONÇALVES¹

RESUMO

Sessenta e oito isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* obtidos, maioritariamente na região demarcada do Dão, a partir de videiras com sintomas de esca e de doença de Petri, foram analisados quanto à sua diversidade fenotípica e molecular a fim de apurar a variabilidade intraespecífica. Foram avaliados parâmetros fenotípicos das colónias dos isolados, tais como textura, cor, diâmetro, zonagem, tipo de margem e ainda, a morfologia das hifas. A caracterização molecular incidiu na sequenciação da região ITS total e alinhamento das sequências, tendo sido feitas análises moleculares com o objetivo de inferir relações filogenéticas entre os isolados, usando o método de ML (Maximum Likelihood).

Tanto as análises fenotípica como molecular diferenciaram dois grupos de isolados, não coincidentes entre si. As análises revelaram igualmente uma elevada homogeneidade entre os isolados, independentemente da sua origem geográfica, do ano de isolamento e da combinação casta / porta-enxerto. Em suma, a hipótese de uma estratégia de reprodução clonal para esta espécie foi novamente comprovada para a população de *Phaeomoniella chlamydospora* em estudo.

Palavras-chave: esca; doença de Petri; *Vitis vinifera*; diversidade genética; sequenciação; região ITS

1 - INTRODUÇÃO

A esca é considerada, na região demarcada do Dão, à semelhança do que acontece noutras regiões vitícolas do globo a sua mais importante doença do lenho (TOMÁZ et al., 1989; SOFIA et al., 2006, 2013). Trabalhos recentes identificam *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingfield & Mugnai) Crous & W. Gams) e

⁽¹⁾ Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-446, Coimbra, Portugal.

⁽²⁾ Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

⁽³⁾ Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, Estação Agrária de Viseu, Estação de Avisos do Dão, 3504-504 Viseu, Portugal. jorge.sofia@drapc.min-agricultura.pt

* Estes autores contribuíram de igual forma para o presente trabalho.

Phaeoacremonium spp. (principalmente *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai, atualmente *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berlese), como os mais importantes agentes patogênicos relacionados com o complexo da esca e da sua manifestação em plantas jovens (Doença de Petri) (CROUS e GAMS, 2000). Contudo, *P. chlamydospora* é a espécie isolada com maior frequência (MUGNAI, 1998; CLEARWATER et al., 2000; PASCOE e COTTRAL, 2000; WHITEMAN et al., 2002), sendo por isso considerada como a principal associada à doença de Petri (RIDGWAY et al., 2005; LAVEAU et al., 2009; POUZOULET et al., 2013).

TELLO et al. (2010) efetuaram a caracterização fenotípica de 57 isolados de *P. chlamydospora* de origem espanhola, tendo verificado haver homogeneidade fenotípica entre todos os isolados estudados, independentemente da sua origem geográfica, ano de isolamento ou da combinação porta-enxerto/casta.

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA é a região mais frequentemente sequenciada em fungos (PEAY et al., 2008) e, tem sido repetidamente proposta como o marcador universal primário de fungos, devido à alta precisão na identificação de fungos e a forte definição entre variação interespecífica e intraespecífica que permite obter (KORABECNA, 2007; SCHOCH et al., 2012). Adicionalmente, a utilidade da região ITS já foi demonstrada para a classificação taxonómica correta de *P. chlamydospora* (CROUS e GAMS, 2000).

Sem teleomorfo descrito para *P. chlamydospora* até à data, é geralmente aceite que a reprodução desta espécie é estritamente clonal, sendo esta estratégia de reprodução suportada pela elevada homogeneidade das populações estudadas em diferentes locais geográficos, com destaque para Espanha (COBOS e MARTÍN, 2008; TELLO et al., 2010), França (BORIE et al., 2002; SMETHAM et al., 2010), Itália (TEGLI et al., 2000a, 2000b), África do Sul (MOSTERT et al., 2006) e Nova Zelândia (POTTINGER et al., 2002; SMETHAM et al., 2010).

TEGLI et al. (2000a), recorrendo a análises por RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat Analysis), reportaram um elevado nível de homogeneidade genética entre 15 isolados italianos. BORIE et al. (2002) descreveram idênticos níveis de diversidade entre, respetivamente, 72 e 34 isolados, provenientes de duas regiões francesas distintas, recorrendo também a análises por RAPD; reportando também o mesmo com 47 isolados provenientes de uma mesma vinha francesa. Recorrendo a análises por RAPDs, ISSRs, AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) e UP - PCR (Universally Primed - Polymerase Chain reaction), POTTINGER et al. (2002) verificaram que baixos valores de variabilidade genética ocorriam entre 39 isolados neozelandeses e seis de origem italiana, sugerindo a ocorrência de múltiplas introduções de populações fúngicas estrangeiras nas vinhas da Nova Zelândia. MOSTERT et al. (2006), usando AFLPs, concluíram que populações da África do Sul, Austrália, França, Irão, Itália, Nova Zelândia, Eslovénia e EUA, apresentavam pequena diversidade genética. Verificou-se também que a variabilidade genética entre diferentes regiões de produção não era significativa, concluindo que as infeções tinham sido causadas por diferentes fontes de inóculo. COBOS e MARTÍN (2008) e TELLO et al. (2010) reportaram baixa diversidade genética entre, respetivamente, 35 e 57 isolados espanhóis, recorrendo a ISSRs, RAPDs e pela análise da região ITS, do gene da β -tubulina e do gene do EF1 α (elongation factor 1- α). Recentemente,

SMETHAM *et al.* (2010) utilizando 60 isolados do sul da Austrália e 67 provenientes do sul de França, analisaram os loci de 18 microssatélites, concluindo estarem perante uma situação de baixa recombinação genética e que estas populações possuíam essencialmente uma estrutura clonal.

O presente estudo tem como objetivo a avaliação e divulgação nacional da variabilidade morfológica e molecular intraespecífica de uma coleção de 68 isolados de *P. chlamydospora* portugueses dos quais 47 da região demarcada do Dão.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram analisados 68 isolados de *P. chlamydospora* maioritariamente provenientes da região do Dão (SOFIA *et al.*, 2015) e obtidos a partir de plantas com sintomas de esca ou de doença de Petri. O isolamento foi efetuado a partir das típicas lesões no lenho de cor negra, normalmente associadas à presença deste agente patogénico (LARIGNON e DUBOS, 1997) em meio de malte agarizado a 2% (MA, Difco, Beckton, Dickinson e Co.). Os procedimentos efetuados para a caracterização fenotípica das culturas (aspeto cultural, coloração, frente de crescimento, zonagem e a morfologia das hifas) e caracterização molecular estão descritos em SOFIA *et al.*, (2015). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (com os números de acesso: KP886950 – KP887017) tendo sido comparadas com as sequências das bases de dados de nucleótidos do “National Center of Biotechnology Information” recorrendo à ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)”. Para a análise filogenética, utilizou-se como “outgroup” *Eutypa lata* (Genbank: KF453558.1).

3 - RESULTADOS

3.1 - Caracterização fenotípica

Após um período de incubação de 30 dias, em 2% MA, sob condições de obscuridade e temperatura de 25 °C, todos os isolados em estudo (68 isolados) formaram as culturas típicas de *P. chlamydospora*. Variações observadas na morfologia das culturas, permitiram o estabelecimento de dois grupos distintos (Tabela 1): o grupo I com 45 isolados que se caracterizava por ter micélio feltroso, verde-oliváceo, frente de crescimento regular e com predomínio de hifas filamentosas e micélio aéreo ralo e, o grupo II, com os restantes 23 isolados, que apresentava micélio feltroso, verde-oliváceo com frente de crescimento branca, crescimento regular e com predomínio de hifas filamentosas e micélio aéreo ralo. Todos os isolados produziram conídios e clamidósporos típicos da espécie, com taxas de esporulação, taxas diárias de crescimento micelial e diâmetros médios de culturas registadas na Tabela 2.

Tabela 1 - Características culturais e morfológicas de 68 isolados de *Phaeoconiella chlamydospora* em 2% MA (malte agar) ao fim de 30 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25 °C

Grupo	Isolados	Culturas em MA ^a	Aspetto cultural	Cor	Frete de crescimento	Zonagem	Morfologia das hifas e micélio
I	1, 2, 3, 4, 5, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69		feltroso	verde-oliváceo	regular	ausente	predominam hifas filamentosas com micélio aéreo raro
II	6, 7, 8, 10, 11, 12, 19, 20, 25, 29, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 41, 46, 54, 57, 63, 66, 67		feltroso	verde-oliváceo, frete de crescimento branca	regular	ausente	predominam hifas filamentosas com micélio aéreo raro

^a - 2% malte agar, face superior

Tabela 2 - Valores médios, máximos e mínimos, da taxa de crescimento micelial diária (mm), a 25 °C, sob condições de obscuridade e, do crescimento micelial (mm) a 25 °C, ao fim de 30 dias, sob condições de obscuridade para o conjunto de 68 isolados *Phaeoconiella chlamydospora* em estudo

Parâmetros fenotípicos	Média ± s ^a		Máximo		Mínimo	
	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II
Taxa de crescimento micelial diária	0,68 ^{ns} ± 0,13	0,68 ^{ns} ± 0,11	0,98	0,93	0,48	0,50
Crescimento micelial ao fim de 30 dias	20,54 ^{ns} ± 3,90	20,52 ^{ns} ± 3,50	29,3	27,87	14,31	14,83

a - valores médios ± desvio padrão de dois conjunto de seis réplicas para cada isolado;
ns - valores não significativamente diferentes calculados usando teste t ($\alpha = 0.05$).

3.2 - Identificação molecular e caracterização filogenética

As sequências da região ITS obtidas foram comparadas com as sequências de referência de *P. chlamydospora* depositadas na base de dados do NCBI. Para o conjunto dos isolados estudados obtiveram-se valores de coeficiente de similaridade de 99%, para todas as sequências com à exceção do isolado 61 que apresentava um coeficiente de similaridade de 100%. Estes valores são adequados para a identificação molecular dos isolados (LANDEWEERT *et al.*, 2003). A sequência ITS completa de cada isolado foi analisada para inferir possíveis relações intraespecíficas recorrendo à estimativa por ML (Maximum Likelihood) (Figura 1).

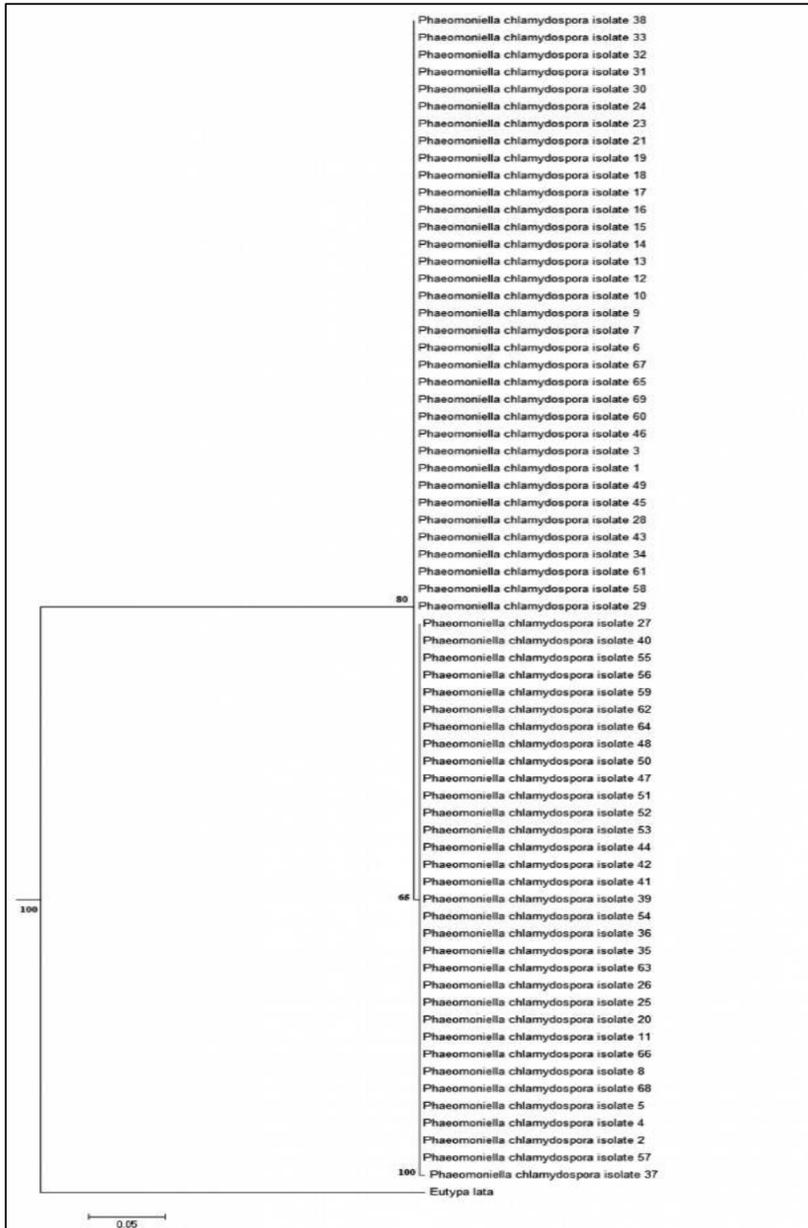


Figura 1 - Árvore de “Maximum Likelihood” após alinhamento das 68 seqüências da região ITS obtidas neste estudo com *Eutypa lata* (KF453558) como “outgroup”. As percentagens de “bootstrap” são indicadas para cada 1000 interações e a escala é representativa de substituições por local/site.

Os resultados mostram uma separação entre dois grupos distintos: um grupo de 33 isolados com um “bootstrap” de 65% e um segundo grupo de 35 isolados separados do primeiro grupo com um “bootstrap” de 80%. A separação destes dois grupos ocorreu devido a um SNP (Simple Nucleotide Polymorphism), nas posições 429 (T/A) e 497 (T/C). Verificou-se que um SNP na posição 534 (C/A) separava o isolado 37 do resto do seu grupo (“bootstrap” de 100%).

4 - DISCUSSÃO

Vários estudos analisaram isolados de *P. chlamydospora* portugueses (CHICAU *et al.*, 2000; REGO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2006; SOFIA *et al.*, 2013), fornecendo, contudo, pouca informação sobre a variabilidade fenotípica e molecular da espécie, pelo que no presente trabalho se efetuou o estudo de 47 isolados de *P. chlamydospora* provenientes do Dão e 21 de outras regiões vitivinícolas portuguesas.

Verificou-se pequena variação fenotípica entre os 68 isolados de *P. chlamydospora* provenientes do Dão e de outras regiões vitícolas portuguesas. Vários trabalhos focando as características morfológicas de isolados de *P. chlamydospora* conduzidos em diferentes países, demonstraram um baixo grau de variação fenotípica (DUPONT *et al.*, 1998; WHITING *et al.*, 2001, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; TELLO *et al.*, 2010). COMONT *et al.* (2010), em França, reportaram a coexistência de duas linhagens clonais predominantes. Contudo as características morfológicas analisadas permitiram agrupar os 68 isolados em dois morfotipos de acordo com o aspeto macromorfológico das culturas. Nos grupos formados, os isolados do Dão surgem par a par com isolados de outras regiões, não havendo uma correspondência evidente com a combinação porta-enxerto/casta, anos de isolamento ou origem geográfica.

TELLO *et al.* (2010), trabalhando com isolados de origem espanhola e SOFIA *et al.* (2013), com isolados portugueses, verificaram maiores taxas de esporulação e de crescimento diário, face aos obtidos no presente trabalho. Estas diferenças serão provavelmente devidas à utilização de um meio de cultura mais pobre e que diferencialmente de TELLO *et al.* (2010), não possibilitaria taxas de esporulação e crescimento superiores às obtidas.

A baixa variabilidade fenotípica observada nas populações portuguesas de *P. chlamydospora*, será, provavelmente, uma consequência da predominância da reprodução clonal associada a esta espécie dando a indicação de que diferentes critérios serão necessários para diferenciar a estrutura da população de grandes conjuntos de isolados.

A análise das sequências ITS agrupou os 68 isolados em dois grupos distintos tendo em conta modificações nos nucleótidos nas posições 429 (T/A) e 497 (T/C). Resultados semelhantes foram verificados para populações espanholas por COBOS e MARTÍN (2008), com as diferenças ocorrendo nas posições 369 (T/A) e 438 (T/C). Verificou-se também que o isolado 37 se encontrava separado do grupo II por um SNP na posição 534 (C/A). As trocas (T/A) e (T/C), parecem de uma forma preliminar, estar presentes em várias populações mundiais e serem os SNPs dominantes para esta espécie (dados não publicados).

Uma vez que três linhagens clonais de *P. chlamyospora* foram detetadas, os resultados sugerem que diferentes fontes de inóculo poderão ter sido introduzidas, nomeadamente através de material de propagação como porta-enxertos, enxertos-prontos e/ou garfos (RETIEF *et al.*, 2006; WHITEMAN *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos estão em concordância com estudos anteriormente realizados na Nova Zelândia, Espanha, Austrália e França (TEGLI *et al.*, 2000a, 2000b; BORIE *et al.*, 2002; POTTINGER *et al.*, 2002; MOSTERT *et al.*, 2006; COBOS e MARTÍN, 2008; SMETHAM *et al.* 2010; Tello *et al.*, 2010). Verifica-se também não haver uma correlação entre os grupos formados de acordo com as características morfológicas e os “clusters” genéticos. A reprodução clonal tem sido descrita para esta espécie (TEGLI *et al.*, 2000a, 2000b; BORIE *et al.*, 2002; POTTINGER *et al.*, 2002; MOSTERT *et al.*, 2006; COBOS e MARTÍN, 2008; SMETHAM *et al.*, 2010; TELLO *et al.*, 2010). A reprodução assexuada é predominante, no entanto, como sugerido por BORIE *et al.* (2002), recombinações por via de um ciclo parassexual podem estar envolvidas, explicando a pequena variabilidade genética encontrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borie B., L. Jacquiot, I. Jammaux-Despréaux, P. Larignon e J. Péros (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamyospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* 51, 85–96.
- Chicau G., M. Aboim-Inguez, S. Cabral e J. Cabral (2000). *Phaeoacremonium chlamyosporum* and *Phaeoacremonium angustius* associated with esca and grapevine decline in Vinho Verde grapevines in north-west Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 80–86.
- Clearwater L., A. Stewart e M. Jaspers (2000). Incidence of the black goo fungus *Phaeoacremonium chlamyosporum* in declining grapevines in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 53, 448.
- Cobos R. e M. Martín (2008). Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamyospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 47, 20–27.
- Comont G., M-F. Corio-Costet, P. Larignon e F. Delmotte (2010). AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamyospora*. *European Journal of Plant Pathology* 127, 451–464.
- Crous P. e W. Gams (2000). *Phaeoconiella chlamyospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112–188.
- Dupont J., W. Laloui e M. Roquebert (1998). Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. *Mycological Research* 102, 631–637.
- Korabecna M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA) gene: its biological meaning and application in medical mycology. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (A. Méndez-Vilas, ed.), Formatex, Spain, 783–787.
- Landeweert R., P. Leeftang, T. Kuyper, E. Hoffland, A. Rosling, K. Wernars e E. Smith (2003). Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied Environmental Microbiology* 69, 327–333.
- Larignon P. e B. Dubos (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147–157.

- Laveau C., A. Letouze, G. Louvet, S. Bastien e L. GuérinDubrana (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 32–46.
- Mostert L., E. Abeln, F. Halleen e P. Crous (2006). Genetic diversity among isolates of *Phaeoconiella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology* 35, 453–460.
- Mugnai L. (1998): A threat to young vineyards: *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Italy. In: Black goo: *Symptoms and occurrence of grape declines-IAS/ICGTD Proceedings*. (L. Morton, ed.), International Ampelography Society, Fort Valley, Virginia, USA, 35–42.
- Pascoe I. e E. Cottral (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 68–75.
- Peay K.G., P. Kennedy e T. Bruns (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58, 799–810. doi:10.1641/b580907.
- Pottinger B., A. Steward, M. Carpenter e H. Ridgway (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 199–211.
- Pouzoulet J., A. Jacques, X. Besson, J. Dayde e N. Mailhac (2013). Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2), 313–324.
- Rego C., H. Oliveira; A. Carvalho e A. Phillips (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 76–80.
- Retief E., A. McLeod e P. Fourie (2006). Potential inoculum sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115, 331–339.
- Ridgway H., J. Steyaert, B. Pottinger, M. Carpenter, D. Nicol e A. Steward (2005). Development of an isolate-specific marker for tracking *Phaeoconiella chlamydospora* infections in grapevines. *Mycologia* 97, 1093–1101.
- Santos C., S. Fragoeiro, H. Valentim e A. Phillips (2006). Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae* 107, 123–130.
- Schoch C., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. Spouge, C. Levesque e W. Chen (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 109(16), 6241–6246.
- Smetham G., P. Ades, J. Péros e R. Ford (2010). Genetic structure of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* in south-eastern Australia and southern France. *Plant Pathology* 59(4), 736–744. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02302.
- Sofia J., M. Gonçalves e H. Oliveira (2006). Spatial distribution of esca symptomatic plants in Dão vineyards (Centre Portugal) and isolation of associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S87–S92.
- Sofia J., T. Nascimento, M. Gonçalves e C. Rego (2013). Contribution for a better understanding of grapevine fungal trunk diseases in Portuguese Dão wine region. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2), 324–334.
- Sofia J., J. Trovão, A. Portugal, H. Paiva de Carvalho, N. Mesquita, T Nascimento, C. Rego, M. T. Gonçalves, (2015). Molecular and phenotypic characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). *Phytopathologia Mediterranea* 54(2), 403–413.
- Tegli S., E. Bertelli, E. Santilli e G. Surico (2000*). Genetic variation within *Phaeoacremonium*

- aleophilum* and *Ph. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 125–133.
- Tegli S., E. Bertelli e G. Surico, (2000b). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 134–149.
- Tello M., D. Gramaje, A. Gómez, P. Abad-Campos e J. Armengol (2010). Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology* 92, 195–203.
- Tomáz I., M. Rego e P. Fernandes (1989). A esca, principal doença do lenho na região dos vinhos do Dão. *Vida Rural* 1474, 10–16.
- Whiteman S., M. Jaspers, A. Stewart e H. Ridgway (2002). Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species specific PCR. *New Zealand Plant Pathology* 55, 139–145.
- Whiteman S., A. Stewart, H. Ridgway e M. Jaspers (2007). Infection of rootstock mother- vines by *Phaeoconiella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36: 198–203.
- Whiting E., M. Cunha e W. Gubler (2005). *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species distinguished through cultural characters and ribosomal DNA sequence analysis. *Mycotaxon* 92, 351–360.
- Whiting E., A. Khan e W. Gubler (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85, 195–201.

O presente trabalho destina-se a divulgação nacional, reproduzindo parte de Sofia et al. (2015).

COST ACTION, AN EUROPEAN RELATIONSHIP BETWEEN RESEARCHERS AND END-USERS

Florence FONTAINE¹ and Cecilia REGO²

SUMMARY

The COST Action FA1303 entitled “Sustainable control of Grapevine trunk diseases (GTD)” focused on huge diseases that affect grapevine, the trunk diseases. GTD are among the most destructive diseases of vineyards worldwide. Fungicides with the potential to control GTD have been banned and there are no highly effective treatments available. Developing sustainable alternatives to manage GTD is therefore required. Currently, there is no coordinated research approach in Europe, even though a strong demand for innovative disease management strategies is given. The goal of this COST Action FA1303 would be to develop a network of European expertise to improve understanding of GTD by acquiring knowledge on occurrence of pathogens, vine-pathogen interaction, ecology of wood-inhabiting microorganisms, and to develop new management protocols and biocontrol approaches. This COST Action gathers leading multidisciplinary academic researchers and institutes within Europe to propose new recommendations for the management of GTD and establish Europe as a world leader in GTD research to safeguard vineyards. This knowledge will be promoted in an effort to increase knowledge and awareness of the problem by disseminating information to end-users and authorities in the viticulture sector, and to the general public.

This COST Action is divided in four Working Groups (WG) which are: WG1 - Pathogen characterization, detection and epidemiology; WG2 - Microbial ecology; WG3 - Host-pathogen and fungus-fungus competitive interactions; and WG4 - Disease management.

A detail presentation of each working group by their respective leader will be done, in term of what we know and what we do not know, to develop the prospects for a future European project.

COST Action FA 1303 website: <http://managtd.eu/>

Keywords: grapevine trunk diseases, pathogens, propagation material, management, sustainable viticulture

⁽¹⁾ Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne - EA 4707, Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Moulin de la Housse - Bât. 18, BP 1039, 51 687 Reims Cedex 2 – France. Email address: florence.fontaine@univ-reims.fr

⁽²⁾ Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. Email address: crego@isa.ulisboa.pt

1 - INTRODUCTION

Chair of the COST Action FA1303: Dr Florence FONTAINE (FR)

Vice Chair of the COST Action FA1303: Dr Josep ARMENGOL (ES)

Grapevine Trunk Diseases (GTD) are among the most important diseases in vineyards. Considering a replacement of 1% of the plants per year – a very considerable underestimate in view of the individual regional data found in the literature – the worldwide annual financial cost of the replacement of death plants due to the grapevine trunk diseases is without doubt in excess of € 1.132 billion. In France, it has been estimated that 11% of vineyards are unproductive due to GTD, with an annual cost of € 14 million: for example, in the Indre-et-Loire area GTD are responsible for 3% mortality of vines. In Spain, it is estimated that, on average, up to 3% of the vines may be affected by GTD, although there are vineyards in which the incidence of the disease may reach more than 20% of the vines, representing high annual economic losses. In Portugal, these diseases are also widely spread all over the grape growing areas, most noticeably in Vinhos Verdes, Dão and Alentejo regions. In some areas of Germany, most prominent in Baden and Palatinate, annual numbers of 5% and more may be observed, with rising tendency in recent years.

This innovative COST Action will create links between different scientific disciplines with a common objective, to safeguard vineyards in European countries. This Action will allow scientists from almost all European grapevine-growing regions to gather and to share common research and applied objectives. Although this Action builds on established projects, it will focus on better understanding GTD expression and develop sustainable management strategies in order to reduce the impact of GTD in European vineyards. Presently, experts from nearly 50 institutions and companies in 21 European (AT, BG, CH, CZ, DE, GR, ES, FR, HR, HU, IL, IT, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, Turkey, UK) (Figure 1), near neighbour (Algeria, Montenegro) and international partners countries (South Africa) countries have already responded to join this Action that leads on the period 2013-2017.

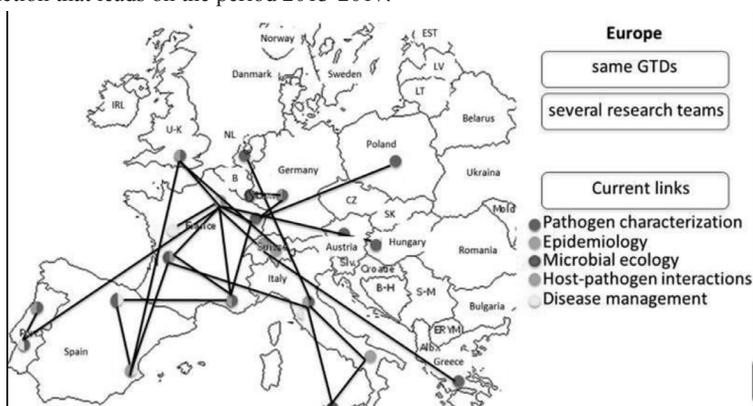


Figure 1 – COST FA 1303 research teams and current links

2 - WORKING GROUPS

2.1 - Working Group 1 - Pathogen characterization, detection and epidemiology

Leaders: Cecilia Rego, PT, and James Woodhall, UK.

The major Grapevine Trunk Diseases (GTD) are Black Foot disease, *Botryosphaeria dieback*, Petri disease, Esca complex (Grapevine leaf stripe disease (GLSD) and White decay), *Eutypa dieback* and *Phomopsis cane leaf spot*. They are caused by a wide range of fungal pathogens which may occur successively and/or in combination. They have a worldwide distribution and vary among different countries. Morphological characters play a major role in the description of fungal species; although, they alone may be not enough to delimit new species. They have to be supplemented with phylogenetic studies using nucleotide sequences of multiple genes (SSU, ITS, LSU, histone, EF1- α and β -tubulin, etc).

Koch's postulates are very difficult to fulfil and little information is available concerning symptoms produced by cross inoculation of fungi and interactions with saprophytic or endophytic fungi as well as with other microorganisms. More information is needed on pathogens life cycles (inocula sources, spore dissemination, environmental factors involved, infection and disease development) to understand the pathogenicity/virulence mechanisms.

This European network will improve understanding of GTD by increasing disease data collection and developing a set of diagnostic protocols for identification/detection of GTD. Set up of standard test conditions will be, as well, crucial to determine the virulence of individual GTD pathogens. We will also focus on characterization of disease cycle according to climatic conditions, identification of the sources of inocula and the way of penetration into the plant, in order to optimize the disease management.

Outputs:

- a collection of 30 isolates of the most important and worthwhile distributed of GTD fungal species is being established with isolates collected among the different countries involved in the COST Action. These cultures will be deposit in CBS-KNAW FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE.
- These similar homogeneous isolates will be DNA barcoded by 11 countries. A ring test will allow the characterization of isolates among different testing laboratories and validate the method.
- Main GTDs pathogens life cycles are available in COST website.
- Questionnaires on the epidemiology and on the practices in vineyard, both sent to end-users in European countries participating to this COST Action, are being finished and will be available by the end of 2016.

2.2 - Working Group 2 - Microbial ecology

Leaders: Patrice Rey, FR and Stéphane Compant, AT.

Recent studies have described the great diversity of the fungal and bacterial communities colonising the wood of grapevines. This diversity is higher in healthy wood than in partially or totally necrotic wood tissues. Depending on the age of the plants, various microbial communities have also been detected; for instance, the fungal communities of young grafted plants (different cultivars) are different from those of adult ones, which raise the question of the succession of fungal communities during plant development.

Studying microbial communities could be helpful in determining a key question in GTD: how exactly does the healthy wood of young vines systematically turn necrotic after a period of several years? In young vines, since potentially pathogenic and plant protective fungi colonize healthy wood tissues, competition between them certainly occurs; in mature vines, however, wood tissues frequently developed necroses, with very few fungal species colonizing these areas. For instance, in the case of white-rot, a typical necrosis of esca, *Fomitiporia mediterranea* predominates. So a decrease in microbial diversity is associated with the development of necroses. What are the factors responsible for these changes? Climate changes, cropping systems, water stress, soil management, pruning practices, and so on, could have an influence on microbial communities in the wood tissues. However, the main driving factors that induce shifts in fungal or bacterial communities, is a question that still needs to be determined.

Another important question is about the role of the bacteria inhabiting the wood tissues of vines. The various bacterial species can display either a positive role in the fungi biocontrol or, a negative role by predisposing the grapevine wood to fungal attacks, through lignin disorganization for example. That could facilitate the process of wood tissue degradation by the fungi already present in the grapevine wood.

Interactions inside microflora, such as fungi and bacteria, can be positive, for the two types of microorganisms, or negative or, even, neutral. Determining the relationships between the most common species colonizing the woods would thus be helpful in determining the future pathogenic status of grapevines.

Outputs:

- Results achieved by sampling, in different countries (standardize method), at veraison, of symptomatic and asymptomatic (foliar symptoms) plants of cultivar (Chardonnay), with the same rootstock, age (15- 20 years-old/ 40-50 years old), training system, organic or conventional, will allow the study microbial communities colonizing wood tissues and the identification of beneficial microorganisms (fungi, bacteria) which may represent (simple or in mixture) a source of potential biocontrol agents.

2.3 - Working Group 3 - Host-pathogen and fungus-fungus competitive interactions

Leaders: Eliane Abou-Mansour, CH and Eckdard Thines, DE.

Esca disease attributed to a group of systematically diverse fungi that are considered to be latent pathogens, several studies present a comparison between the mycota of healthy and diseased plants from the same vineyard, in order to determine which fungi become invasive as foliar symptoms of esca appear. Esca pathogens colonize woody plants and cause the degradation of the xylem and dieback of the host plants. Despite the serious damage of the disease, the reason for expressing strong leaf symptoms in host plants colonized by wood destroying fungi is unknown and stills an important question in plant physiology and phytopathology.

Pathogenesis factors implicate several molecular pathogen signatures which have been identified at biochemical level such as enzymes and phytotoxins. Esca fungal wood pathogens produce lignin, pectin, and cellulose degrading enzymes and release lignin monomers. Lignin monomers act as signalling molecules in micromolar concentrations. The perception system for these signals remains unknown. Several toxic compounds, phytotoxins, including toxic polysaccharides and polypeptides have been isolated from the main fungi implicated in esca disease, but, a part of eutypine from *E. lata*, toxins receptors of other phytotoxins have not yet been identified.

In response to pathogen attack grapevine develop a chemical barriers by increase polyphenols and phytoalexins in wood and leaves, a structural barriers by the formation of tyloses to stop the progression of mycelia and a burst of oxidative reactive oxygen species which directly act as antibiotic or as secondary stress signals leading to the induction of various defence-related genes expression. But all these stereotypic defense responses are not enough to stop the progression of the fungi.

It is well known that fungi have a role in symptoms development but remain the question of other microbiota, no information is available on the interaction between other non- pathogenic fungi, bacteria and viruses and the stimuli of phytotoxins production still unknown.

Because repulsion of a microbial attack by plants requires the coordinated action of hundreds of genes, a comparative genomics will contributes to the identification of the differences in defense strategies between tolerant and sensitive plants. Identification of a molecular marker for early diagnostic of the disease enables screening tolerant cultivars.

Outputs:

- Guidelines protocols for inoculation, isolation methods and to fulfil Koch's postulates are in progress and will be available in website COST Action.
- To designate a susceptible cultivars as common reference.
- To discuss on the "communication" between wood and leaf by investigated on signalling among wood inhabiting microorganisms and on signalling mechanisms in plants. For that, the study will be restricted to Esca (Pal, Pch) and Botryosphaeria dieback pathogens.

2.4 - Working Group 4 - Disease management

Leaders: Stefano Di Marco, IT and David Gramaje, ES

GTD are characterized by complex interactions occurring among the pathogens involved and agronomical, meteorological and physiological factors. Several GTD peculiarities, mainly the erratic and not completely cleared nature of foliar symptom expression, make the effectiveness of control strategies much difficult. The control is still based on cultural practices which at best can mildly reduce the impact of the disease.

GTD can affect plants in the nursery at any phase of propagation process and in the vineyard. In the nursery, hot water treatment, application of biological control agents (BCA) or chemicals gave some interesting results in the reduction of pathogen incidence, but need to be improved for time and mode of applications. In the vineyard, banned the use of arsenite compounds, fosetyl-Al applied on foliage to control downy mildew was the only treatment that provided a certain decrease in foliar symptom expression in well- conducted vineyards. Recently, treatments with nutrients or with formulations of copper that seem able to penetrate woody tissues appeared to be able to reduce the incidence of symptomatic plants; hypotheses on mode of action and mechanisms involved are being investigated. The main effort is directed toward the protection of pruning wound to prevent or reduce the establishment and development of GTD; BCA or chemicals that proved to be effective towards artificial inoculations of GTD pathogens in the vineyard are being tested. Treatments with BCA, *Trichoderma* in particular, seem to reduce the symptomatic or dead plants after some years of applications.

The definition by this European network of a common EPPO standard for the evaluation of plant protection products is a precondition to develop effective and shared control methods.

The management of GTD will be focused on the development of an integrated environmentally-friendly control strategy both in the nursery and in the vineyard: in the nursery for the production of free (or reduced risk) material; in the vineyard for the protection of pruning wounds and for the reduction of incidence and severity of foliar symptom expression.

Outputs:

- Results on a European nursery survey COST Action FA1303 was published by Gramaje and Di Marco, (Gramaje, D. and Di Marco, S. (2015). Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathologia Mediterranea* (2015) 54, 2, 313–324). The study identified several risks factors which could increase infection by fungal trunk pathogens during the propagation processes, as well as a clear need for further research into the effects of treatments on grapevine viability, including hot water treatment, and the potential of biological agents and other strategies such as ozonation to control grapevine trunk diseases in nurseries.

- A translated questionnaire about cultural practices for the management of GTDs in the vineyard is being distributed to viticulturists through each MC member, to Professional organizations, magazines and journals in order to reach as many viticulturists as possible.

3 – CONCLUSIONS

To conclude, the complexity of Grapevine Trunk Diseases was emphasized; pointing out that a multidisciplinary research is needed in order to obtain new and improved knowledge about the biology and, epidemiology of the fungal pathogens, microbial ecology, host- pathogen and fungus-fungus competitive interactions and disease management. The main conclusion was that Grapevine Trunk Diseases threaten viticulture and wine production in Europe. The Cost Action FA 1303 is making possible the organization of a net of European researchers, but this is not enough to achieve the goal of a sustainable viticulture. In this sense, it is very urgent to establish a European Research Programme to develop sustainable strategies to control Grapevine Trunk Diseases under the frame of the H2020 - Societal Challenge n°2 - “Food security, sustainable agriculture and forestry, marine, maritime and inland water research and the bioeconomy”.

ESTRATÉGIAS DE COMBATE AO OÍDIO DA Videira (*Erysiphe necator*) FACE AOS FENÓMENOS DE RESIS- TÊNCIA A FUNGICIDAS

Pedro CLÍMACO¹; Jorge CUNHA^{1,2}; Amândio CRUZ³; Rogério de CASTRO³

RESUMO

O oídio é, sem dúvida, uma doença chave da videira (*Vitis vinifera* L.) pois todos os anos afeta a maioria do vinhedo nacional, principalmente, nos meses de maio, junho e julho, necessitando por isso de um combate eficaz, de modo a se evitarem prejuízos significativos ou muito significativos, quer a nível quantitativo, quer sobre a qualidade da uva à vindima.

Nesta comunicação procura-se clarificar e simplificar a análise desta problemática, recorrendo à sistematização e exemplificação acessível a técnicos vitícolas e a viticultores esclarecidos. Assim, apresentam-se os fungicidas normalmente utilizados no combate ao oídio da videira, organizados a partir do modo de ação das suas substâncias ativas e dos diferentes “grupos” químicos a que pertencem. Simultaneamente, e no âmbito de uma gestão responsável dos fenómenos de resistência ao oídio, são efetuados alguns comentários ou recomendações, relativamente ao papel que os diferentes tipos de fungicidas devem desempenhar numa estratégia de proteção eficaz do vinhedo. Para o efeito, os autores recorreram a informação recente disponibilizada pelos serviços oficiais franceses que tem desenvolvido trabalho nesta área, nomeadamente, DGAL-SD-QPV, Anses - RPP, INRA, CIVC e IFV.

Palavras-chave: videira, oídio, fungicidas, fenómenos de resistência

INTRODUÇÃO

Enquanto o míldio da videira (*Plasmopara viticola*) tem uma presença esporádica mas muito intensa e com efeitos praticamente irreversíveis, o oídio (*Erysiphe necator*) tem uma presença muito mais constante, quase sempre anual, na maioria das vinhas das diferentes regiões vitivinícolas nacionais, e cuja intensidade inicial é normalmente inferior. Apesar dessas diferenças, as principais doenças da videira têm em comum a necessidade/conveniência de se intervir de modo preventivo, de modo a garantir o êxito de cada intervenção fitossanitária e, assim, diminuir o risco de aparecimento de prejuízos.

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), 2565-191 Dois Portos. Portugal; **E-mail:** pedro.climaco@iniav.pt;

² Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Green-it Unit, Oeiras. Portugal

³ Instituto Superior de Agronomia (ISA/UL), Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa. Portugal

Existem na fitossanidade vitícola nacional dois problemas recorrentes: 1- o recurso sucessivo a um mesmo fungicida ou a mais do que um fungicida, mas pertencendo frequentemente ao mesmo grupo de substâncias ativas; 2- a existência de uma certa

confusão nalguns grupos de viticultores, originada quer pela diversidade de marcas de fungicidas no mercado, quer pela diversidade de substâncias ativas e de formulações diferenciadas.

Importa, assim, tornar mais explícita e compreensível toda a problemática ligada à gestão adequada dos fenómenos de resistência do oídio da videira a alguns fungicidas, de modo a que seja possível atingir níveis superiores de eficácia na luta contra esta doença na maioria do vinhedo nacional.

ESTRATÉGIAS DE COMBATE AO OÍDIO DA VIDEIRA

Na luta anti-oídio da videira, encontram-se disponíveis no mercado nove tipos de substâncias ativas as quais, devido às suas características peculiares, leva-nos a distribuí-las por 3 grupos (A, B e C).

O grupo A é constituído por 2 tipos de substâncias ativas que têm em comum pertencerem a fungicidas de contacto ou de superfície que têm modo de ação multi-sítio (isto é, que possuem múltiplos modos de atuação), não sendo por isso suscetíveis a fenómenos de resistência (Quadros 1 e 2):

Quadro 1 – Fungicidas com substância ativa à base de Minerais.

<p><u>Elemento Químico: Enxofre</u> Enxofre molhável - exemplo: KUMULUS Enxofre em pó - exemplo: BAGO DE OURO</p>	<p><u>É um fungicida de contacto, com modo de ação multi-sítio e sem resistências conhecidas.</u></p>
---	---

Quadro 2 – Fungicida com substância ativa à base de derivados do Fenol.

<p><u>Grupo Químico: Dinitrofenol</u> Meptildinocape - exemplo: KARATHANE STAR</p>	<p><u>É um fungicida de contacto, com modo de ação multi-sítio e sem resistências conhecidas.</u></p> <p>O meptildinocape à concentração recomendada pode causar toxicidade nas folhas, quando a temperatura do ar atingir cerca de 32° C.</p>
---	--

O grupo B é constituído por 3 tipos de substâncias ativas que apesar de serem fungicidas penetrantes ou, mesmo sistémicos, têm uma ação essencialmente preventiva, por já terem sido detetados fenómenos de resistência do oídio a estes fungicidas. Assim, em situações de ataque de oídio já declarado, por princípio, não se deve recorrer a estas substâncias ativas (**Quadros 3, 4 e 5**).

Quadro 3 – Fungicidas com substância ativa à base de IDM (Inibidores da Demetilação na biossíntese dos esteróis) ou seja, à base de IBE do grupo 1.

<p><u>Grupo Químico: Triazol</u> Difenoconazol Fenbuconazol - exemplo: POLKA Miclobutanil - exemplo: SELECTANE Penconazol - exemplo: TOPAZE Tebuconazol - exemplo: HORIZON Tetraconazol - exemplo: EMINENT 125</p>	<p><u>Apesar de se tratarem de fungicidas sistêmicos, devem ser utilizados, essencialmente, como fungicidas preventivos.</u></p> <p>Com efeito, foram detetados há já alguns anos fenómenos de resistência do oídio a fungicidas à base de IDM.</p> <p>Portanto, em situações de ataque de oídio declarado não se deve recorrer a estas substâncias ativas isoladamente.</p>
---	--

Quadro 4 – Fungicidas com substância ativa à base de Azanaftalenos (AZN).

<p><u>Grupo Químico: Quinozolinona</u> Proquinazida - exemplo: TALENDO</p> <p><u>Grupo Químico: Fenoxiquinolona</u> Quinoxifena - exemplo: VENTO 25</p> <p><u>Grupos Químicos: Fenoxiquinolona + Triazol</u> Quinoxifena + Miclobutanil - exemplo: ARITHANE</p>	<p><u>Trata-se de fungicidas penetrantes, mas com ação, essencialmente, preventiva.</u></p> <p>Com efeito, foram detetados fenómenos de resistência do oídio da videira relativamente a substâncias ativas à base de AZN (Proquinazida e Quinoxifena).</p> <p>Assim, em situações de ataque de oídio declarado não se deve recorrer a estas substâncias ativas.</p>
---	---

Quadro 5 – Fungicidas com substância ativa à base de QoI (Quinone outside Inhibitors – Inibidores da Quinona externa).

<p><u>Grupo Químico: Estrobilurinas</u> Azoxistrobina - exemplo: QUADRI Cresoxime-metilo - exemplo: STROBY WG Trifloxistrobina - exemplo: FLINT</p> <p><u>Grupos Químicos: Estrobilurina + Triazol</u> Trifloxistrobina + Tebuconazol - exemplo: FLINT MAX</p> <p><u>Grupos Químicos: Estrobilurina + Ditiocarbamato</u> Piraclostrobina + Metirame - exemplo: CABRIO TOP</p>	<p><u>Trata-se de fungicidas penetrantes, mas com ação, essencialmente, preventiva.</u></p> <p>Com efeito, existem algumas estirpes de oídio com resistência aos fungicidas à base de QoI.</p> <p>Assim, em situações de ataque de oídio declarado não se deve recorrer a estas substâncias ativas.</p>
---	---

Como nota complementar aos fungicidas pertencentes ao grupo B importa salientar que não se devem utilizar em sucessão fungicidas à base de IDM, AZN e QoI (DGAL-SDQPV et al., 2015) como é o caso, por exemplo, da sequência: TOPAZE + TALENDO + QUADRIS ou de outras equivalentes. Com efeito, é mais seguro alternar tratamentos fitossanitários com substâncias ativas sujeitas a fenómenos de resistência (QoI, IDM ou AZN) com fungicidas não sujeitos a resistência e, portanto, oferecendo uma maior eficácia na luta anti-oidio. Contudo, em determinadas situações de oídio declarado existe, entre outras soluções, a possibilidade de recorrer, por exemplo, a uma mistura de KARATHANE STAR (Quadro 2) a 50% da sua concentração máxima recomendada, com um fungicida à base de IDM (Quadro 3) à concentração normal.

No que se refere às Estrobilurinas (QoI) é de salientar que têm particular interesse no combate a outras doenças, como é o caso das doenças do lenho (ao abrolhamento) e, também, na prevenção do black-rot tardio (do bago de ervilha ao pintor). Contudo, como referido anteriormente apresentam certas debilidades na luta anti-oidio, principalmente, no período pós floral.

O grupo C, por sua vez, é constituído por 4 tipos de substâncias ativas que têm em comum pertencerem a fungicidas penetrantes ou sistémicos que não são sujeitos, até à data, a fenómenos de resistência conhecida relativamente ao oídio da videira (**Quadros 6, 7, 8 e 9**). No entanto, nas substâncias ativas deste grupo foram já detetados fenómenos de resistência relativamente a outros oídios ou a outros fungos (*Botrytis cinerea*) pelo que devem ser utilizados com precaução, de modo a preservar a sua eficácia no presente e no futuro.

Quadro 6 – Fungicidas com substância ativa à base de Benzofenona.

<p>Grupo Químico: Benzofenona Metrafenona – exemplo: VIVANDO Piriofenona – exemplo: KUSABI</p>	<p><u>Trata-se de fungicidas penetrantes, sem resistência conhecida relativamente ao oídio da videira.</u> Recomenda-se limitar a 2 o número máximo de aplicações por ano, as quais não devem ser consecutivas em situações de ataque de oídio já evidenciado.</p>
---	---

Quadro 7 – Fungicida com substância ativa à base de Aminas (IBE do grupo 2).

<p>Grupo Químico Espiroquetalamina Espiroxamina - exemplo: PROSPER</p>	<p><u>Trata-se de um fungicida sistémico, sem resistência conhecida relativamente ao oídio da videira.</u> Recomenda-se limitar a 2 o número máximo de aplicações por ano, as quais não devem ser consecutivas em situações de ataque de oídio já evidenciado.</p>
--	---

Quadro 8 – Fungicidas com substância ativa à base de SDHI (Inibidores da Succinato Desidrogenase).

<p>Grupo Químico: Carboxamida + Estrobilurina (QoI) Boscalide + Cresoxime de metilo – exemplo: COLLIS</p> <p>Grupo Químico: Piridinil – benzamida + Triazol (IDM) Fluopirame + Tebuconazol - exemplo: LUNA EXPERIENCE</p>	<p><u>Trata-se de fungicidas sistêmicos, sem resistência conhecida relativamente ao oídio da videira.</u></p> <p>Recomenda-se limitar a 2 o número máximo de aplicações por ano, as quais não devem ser consecutivas em situações de ataque de oídio já evidenciado.</p>
---	--

Quadro 9 – Fungicida com substância ativa à base de Amidoximas.

<p>Grupo Químico: Fenil-acetamida + Triazol (IDM) Ciflufenamida + Difenconazol - exemplo: DYNALI</p>	<p><u>Trata-se de um fungicida sistémico, sem resistência conhecida relativamente ao oídio da videira.</u></p> <p>Recomenda-se limitar a 2 o número máximo de aplicações por ano, as quais não devem ser consecutivas em situações de ataque de oídio já evidenciado.</p>
---	---

Na maioria das situações concretas de combate ao oídio da videira é sempre mais económico prevenir atempadamente para não ter que remediar. Com efeito, quanto mais tardiamente se procura solucionar a presença visível de oídio na vinha, mais elevados serão os prejuízos sobre a quantidade e a qualidade da vindima, bem como os custos da erradicação da doença, os quais se prolongam frequentemente para o ano agrícola seguinte. Quando o ataque de oídio se torna intenso sobressai, principalmente, a perda de produção, a qual se torna muito relevante. Nas situações intermédias avulta, essencialmente, a perda de qualidade da vindima a qual se pode tornar muito gravosa, dado que o fendilhamento da película dos bagos provocado pelo oídio abre as portas à instalação da podridão cinzenta, a qual se as condições climáticas forem medianamente favoráveis serão suficientes para impedir a produção de vinhos com direito a DOP ou a IGP. Nos casos mais graves, a podridão cinzenta poderá ainda dar origem à podridão ácida e à subsequente contaminação do vinho, o que o pode tornar impróprio para consumo.

CONCLUSÕES

A luta contra o oídio da videira (*Erysiphe necator*) nunca teve à sua disposição tantas substâncias ativas alternativas como hoje, pelo que uma gestão sustentável, ou seja, criteriosa, adequada e atempada dos fungicidas anti-oídio existentes permitirá diminuir drasticamente os prejuízos com esta doença que, atualmente, ainda se verificam na maioria das regiões vitícolas nacionais.

As observações ou recomendações efetuadas neste trabalho tiveram exclusivamente em atenção a gestão dos fenómenos de resistência do oídio a fungicidas, pelo que não se efetuam juízos de valor sobre a eficiência intrínseca das diferentes substâncias ativas consideradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAYER CROP SCIENCE (2012). Manual Bayvitis: A fitossanidade da videira, 331 pp, II Edição. Carnaxide. Portugal.
- DGAL-SDQPV, ANSES-RPP, INRA, CIVC, IFV (2015). Note technique commune gestion de la résistance 2015. Maladies de la vigne. Mildiou, oïdium, pourriture grise. France (versão *online*).
- DGAL-SDQPV, ANSES-RPP, INRA, CIVC, IFV (2014). Note technique commune gestion de la résistance 2014. Maladies de la vigne. Mildiou, oïdium, pourriture grise. France (versão *online*).
- DGAV (2015). Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada. MAM. Lisboa (versão *online*).
- SNA A (2015). Avisos Agrícolas. Estação de Avisos do Douro. Circular n° 3/2015. Características dos fungicidas anti-oídio. DRAPN. Peso da Régua (versão *online*).

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES AO ABROLHAMENTO EM TOURIGA NACIONAL E EM CABERNET SAUVIGNON INFETADAS COM OS VÍRUS DO URTICADO E DO ENROLAMENTO FOLIAR

Filomena FONSECA¹, Margarida TEIXEIRA SANTOS^{2*}, João BRAZÃO³, José Eduardo EIRAS-DIAS³

RESUMO

A degenerescência infecciosa e o enrolamento foliar são as viroses mais importantes que afetam a videira. O vírus do urticado ou nó-curto- Grapevine fanleaf virus (GFLV) é o vírus mais importante do complexo da degenerescência infecciosa. O vírus do enrolamento foliar 3- Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV 3)

é o vírus do complexo do enrolamento foliar das videiras mais disseminado em Portugal. Neste trabalho estudamos os genes expressos diferencialmente (DEG) ao abrolhamento numa vinha comercial em Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon na presença de GFLV e GLRaV3. Em Touriga Nacional também se identificou os DEGs em infecção mista de GFLV e GLRaV3. Para cada DEG identificado foi desenhado um par de primers para a validação da quantificação por PCR em tempo real. Os genes identificados distribuem-se por 10 dos cromossomas da videira e também pelo do cloroplasto. Nove dos genes estão bem caracterizados e estão relacionados com a defesa da planta, a sinalização de “stress” e o funcionamento do cloroplasto. Quatro dos restantes loci não estão ainda anotados. Cada casta reage de modo distinto à presença de cada vírus reforçando as observações de campo que indicavam que cada casta se comporta de modo diferente em relação à presença de viroses.

Palavras-chave: Genes expressos diferencialmente-DEG; Vírus; GFLV; GLRaV 3; Touriga Nacional; Cabernet Sauvignon; abrolhamento

1. - INTRODUÇÃO

As viroses mais importantes que afetam as videiras em todas as regiões vitícolas mundiais são a degenerescência infecciosa e o enrolamento foliar (MAREE *et al.* 2013, MARTELLI 2014). Tanto em Portugal, como na União Europeia, os materiais de

¹ Universidade do Algarve-CIMA, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Quinta do Marquês, 2784-505, Oeiras, Portugal **margarida.santos@iniav.pt*

³ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Quinta da Almoíña, 2565-191, Dois Portos, Portugal

propagação vegetativa de videira certificados devem estar isentos de ambas as viroses (Decreto-Lei 194/2006, Diretivas 68/183/CEE e 2004/28/CE). Estas viroses causam reduções na produção e alterações na qualidade das uvas, e a medida de como afetam cada casta é dependente desta (MARTELLI 2014).

O vírus do urticado ou nó-curto- *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) é o *Nepovirus* (família *Secoviridae*, ordem *Picornavirales*) mais importante do complexo da degenerescência infecciosa, e inclui duas estirpes: a que induz malformações e a que induz cloroses (DIAS 1963). O GFLV é transmitido pelo nemátode *Xiphinema index* Thorne and Allen (HEWITT et al 1958). Os sintomas do GFLV são visíveis nas primeiras semanas após o abrolhamento. As estirpes que induzem malformações originam distorções no caule como nós curtos, folhas com seios peciulares abertos e assimétricas, inflorescências pequenas que resultam depois em cachos com bagoinha. As estirpes que causam clorose originam folhas e inflorescências cloróticas que resultam em folhas com o sistema fotossintético comprometido e cachos abortados ou com bagoinha (HEWITT et al. 1970). As cepas são em geral de porte mais pequeno. Os sintomas tornam-se pouco perceptíveis após o aumento da temperatura (MARTELLI 2014).

O vírus do enrolamento foliar 3- *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV 3) é o membro tipo dos *Ampelovirus* (família *Closteroviridae*), e é o vírus do complexo do enrolamento foliar nas videiras mais disseminado em Portugal (SANTOS 2011). O GLRaV 3 é transmitido por Hemípteros das família *Coccidae* e *Pseudococcidae*, vulgo cochonilhas, dos géneros *Heliococcus*, *Phenacoccus*, *Planococcus*, *Pseudococcus*, *Ceroplastes*, *Coccus*, *Neopulvinaria*, *Pulvinaria*, *Phartenolecanium*, e *Saissetia* (TSAI et al. 2010). Os sintomas de enrolamento só são visíveis na maioria das castas após o pintor e em algumas só mesmo após a vindima. Inicialmente, as folhas mais velhas nas castas tintas ficam com a região entre nervuras vermelhas e, nas castas brancas a região entre nervuras fica amarela, permanecendo as nervuras principais verdes. Num grande número de castas estas folhas enrolam depois para baixo e para dentro. O conteúdo em clorofila diminui entre 21 a 26% após o aparecimento dos sintomas (ENDESHAW et al 2014). Antes e após o aparecimento dos sintomas a fotossíntese, a condutância estomacal e a transpiração são significativamente reduzidas nas plantas infetadas quando comparadas com as não afetadas (ENDESHAW et al. 2014). No final do ciclo a maioria das folhas está afetada. Há um retardamento no amadurecimento das uvas e este não é homogéneo. O teor de açúcar é afetado assim como a cor (MAREE et al. 2013). Estes sintomas são tanto mais pronunciados quanto mais tardia é a vindima. A perda anual causada pelo enrolamento foliar em vinhas de Cabernet Sauvignon na África do Sul é estimada em 300-2400 dólares por hectare (FREEBOROUGH e BURGER 2008); em vinhas de Cabernet Franc no estado de Nova Iorque é estimada em 1000-1600 dólares por hectare (ATALLAH et al. 2006) e em vinhas de Alvarinho na Galiza é de 2000 euros por hectare (CABALEIRO et al. 2013). A sequenciação do genoma de videira veio permitir estudar as interações entre a planta e os agentes causais de doenças ao nível da transcrição genómica, permitindo elucidar os genes que são afetados pelos diferentes patogénios.

Neste trabalho iniciamos o estudo dos genes que são expressos diferencialmente em Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon na presença de GFLV e GLRaV3 ao abrolhamento, que é o ponto inicial do ciclo anual da videira.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Plantas das castas Touriga Nacional (TN) e Cabernet Sauvignon (CS) numa vinha comercial da região dos vinhos de Lisboa sem vírus e infetadas com GFLV e GLRaV3 foram seguidas durante dois anos e sistematicamente testadas por ELISA e RT-PCR para vírus. Ao abrolhamento do ano 2012 foram colhidos gomos de pelo menos quatro plantas de cada casta com e sem os vírus e imediatamente congelados a -20°C . Foi extraído RNA total de cada gomo usando o kit E.Z.N.A.TM Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, USA). Usando o “kit” GeneFishing (Seegene, Coreia) foram identificados os genes expressos diferencialmente (DEG) no conjunto dos gomos de cada modalidade (por vírus e por casta). As bandas obtidas foram cortadas dos géis e ligadas ao vetor pGEM, clonadas (*E.coli* DH5 α) e sequenciadas. Foi efetuada uma análise por BLAST de cada sequência identificada usando as bases de dados EST e “Reference RNA sequences” do Genbank para *Vitis vinifera* (taxid 29760) o que permitiu identificar cada DEG. Para cada DEG identificado foi desenhado um par de “primers” para a validação da quantificação por PCR em tempo real (qPCR), usando o método da curva padrão relativa. Um conjunto de genes de referência (NAD5, β -actin, EF1 α e GAPDH) foi testado para a normalização do qPCR. Foi usado o programa Normfinder (Andersen et al. 2004) para identificar os genes de referência mais estáveis para cada casta. A validação da quantificação foi feita para cada planta individualmente. Foi calculada uma “one-way ANOVA” seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

3. - RESULTADOS E CONCLUSÃO

Associados à resposta a infeções com GFLV e GLRaV3 foi identificado um conjunto de genes expressos diferencialmente em Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon. Em Touriga Nacional foram também identificados os genes expressos diferencialmente em infeção mista de GFLV e GLRaV3. Quase todos os genes são expressos de modo significativamente diferente em cada modalidade. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Os genes identificados distribuem-se por 10 dos cromossomas da videira e também pelo cloroplasto. Nove dos genes estão bem caracterizados e as suas funções estão relacionadas com a defesa da planta, a sinalização de “stress” e o funcionamento do cloroplasto. Quatro dos restantes *loci* não estão ainda anotados.

Tabela 1. Expressão diferencial de genes (DEG) validados por qPCR nas castas Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon infetadas com os vírus do urticado (GFLV) e do enrolamento foliar 3 (GLRaV3).

DEG	Alteração da expressão dos genes em relação às videiras sem vírus				
	(1,0) *				
	Touriga Nacional			Cabernet Sauvignon	
	GFLV	GLRaV3	GFLV+GLRaV3	GFLV	GLRaV3
Succinate-semialdehyde dehydrogenase mitochondrial-like	0,18	1,46	1,60	0,17	0,47
CORA transcript variant X1	0,13	0,48	1,03	1,84	1,68
Dehydrin ERD14	1,73	2,28	1,86	1,33	1,87
EST of abiotic stressed leaves of <i>V. vinifera</i>	0,03	1,15	0,27	0,13	1,67
E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	0,08	1,57	0,12	0,31	0,73
Glycine-rich RNA-binding protein GRP2A	0,79	0,89	0,78	3,39	1,06
Multiprotein-bridging factor 1a-like	1,46	2,11	1,95	1,75	2,16
Calcium-dependent protein kinase 32-like	0,33	2,47	0,82	0,77	1,65
<i>V. vinifera</i> loci não anotados	0,62	1,88	2,43	2,74	1,10
Photosystem I - P700 chlorophyll a apoprotein A2 (psaB)	1,51	0,68	0,53	4,59	3,12
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	2,42	1,85	1,41	3,96	1,52

- Valores significativamente diferentes calculados usando o teste de comparação múltipla de Tukey (P <0,05)

Cada casta reage de modo distinto à presença individual de cada vírus (Tabela 1). Para um mesmo gene pode haver um aumento da expressão numa casta na presença de um dos vírus e uma diminuição da expressão para o outro vírus. Alguns dos genes em ambas as castas seguem um mesmo padrão de expressão na presença do mesmo vírus ainda que com diferenças quantitativas, mas noutros casos seguem um padrão distinto para o mesmo vírus. A título de exemplo o gene do cloroplasto *ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit* tem a seguinte expressão relativamente às plantas sem vírus (valor igual a 1): 2,42 vezes em TN+GFLV; 1,8 vezes em TN+GLRaV3; 1,41 vezes em TN+GFLV + GLRaV3;

3,96 vezes em CS+GFLV; e 1,52 vezes em CS+GLRaV3. Todos estes valores são significativamente diferentes entre si e em relação às plantas sem vírus da mesma casta. O gene *CORA transcript variant X1* tem a seguinte expressão relativamente às plantas sem vírus (valor igual a 1): 0,13 vezes em TN+GFLV; 0,48 vezes em TN+GLRaV3; 1,03 vezes em TN+GFLV + GLRaV3; 1,84 vezes em CS+GFLV; e 1,68 vezes

em CS+GLRaV3. Neste caso TN infetada com GFLV e TN infetada com GLRaV3 têm uma clara diminuição de expressão do gene em relação à planta não infetada e CS com GFLV e CS com GLRaV3 têm um aumento da expressão do mesmo gene.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam as observações de campo que indicavam que cada casta se comporta de modo diferente em relação à presença de viroses. O presente estudo fornece uma base para a seleção de vários genes candidatos para posterior análise funcional e genómica comparativa com outras cultivares de videira.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FCT projeto PTDC/AGR-ALI/109859/2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN C.L., LEDET-JENSEN J., ØRNTTOFT T. (2004) Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* 64: 5245-5250
- ATALLAH S., GOMEZ M., FUCHS M., MARTINSON T. (2012). Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv Cabernet Franc. *Am.J.Enol.Vitic.* 63, 73–79.
- CABALEIRO C., PESQUEIRA A.M., BARRASA M., GARCIA-BERRIOS J. J. (2013) Analysis of the losses due to grapevine leafroll disease in Albariño vineyards in Rías Baixas (Spain) *Ciência Téc. Vitiv.* 28:43-50
- DIAS H.F. (1963). Host range and properties of grapevine fanleaf, and grapevine yellow mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol.* 51: 97-105.
- ENDESHAW S.T., SABBATINI P., ROMANAZZI G., SCHILDER A.C., NERI D. (2014) Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc. *Scientia Horticulturae* 170 (2014) 228–236
- FREEBOROUGH, M.-J., BURGER, J.T. (2008) Leafroll: Economic implications. *Wynboer, A technical Guide for Wine Producers.*
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200812-leafroll.php3>
- HEWITT, W.B.; MARTELLI, G.P.; DIAS, H.; TAYLOR, R.H. (1970). *Fanleaf virus of grapevine.* CMI/AAB Descriptions of plant viruses, 28, 4 p.
- HEWITT, W.B.; RASKI, D.J.; GOHEEN, A.C. (1958). Nematode vector of soil-borne Fanleaf virus of grapevine. *Phytopathology* 48: 586-595

- MAREE H.J., ALMEIDA R.P.P., BESTER R., CHOOI K.M., COHEN D., DOLJA V.V., FUCHS M.F., GOLINO D.A., JOOSTE A.E.C., MARTELLI G.P., NAIDU R.A., ROWHANI A., SALDARELLI P., BURGER J.T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* 4: 82/138-158
- MARTELLI, G. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents *Journal of Plant Pathology* 96:S1-S136
- SANTOS, M.T. (2011) Os vírus do urticado e do enrolamento foliar da videira In: *Agrorrural: contributos científicos*, pp650-658. INCM, Lisboa. (TSAI C.W., ROWHANI A., GOLINO D.A., DAANE K.M., ALMEIDA R.P.P. (2010) Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* 100: 830-834.

FUNGICIDAS AUTORIZADOS NA PROTEÇÃO FITOSANITÁRIA DA Videira AO OÍDIO

Assunção PRATES⁽¹⁾ & Miriam CAVACO⁽²⁾

RESUMO

Na cultura da videira, a doença mais importante e responsável pelo maior número de tratamentos fitossanitários realizados por campanha é o oídio causado pelo patógeno *Erysiphe necator* (anteriormente designado por *Uncinula necator*). A espécie *E. necator* é um patógeno de elevado risco de desenvolvimento de resistências e está sujeito a uma elevada pressão de selecção; a conjugação destes dois fatores tem induzido o aparecimento de estirpes resistentes a diversos grupos de fungicidas.

A descoberta de novas substâncias ativas eficazes no combate ao oídio da videira (*Erysiphe necator*), veio aumentar o número de famílias químicas e modos de ação disponíveis no mercado nacional no combate a esta doença. Por este motivo, parece-nos oportuno, apresentar uma síntese atualizada dos fungicidas autorizados em Portugal, agrupados segundo o seu modo de ação, de acordo com a classificação adoptada pelo FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*), com a caracterização quanto à atividade biológica, mobilidade na planta e persistência de ação. Nesta síntese incluíram-se as limitações estabelecidas em Portugal para a gestão da resistência do *Erysiphe necator* a fungicidas de risco.

Esperamos assim contribuir para a seleção adequada dos fungicidas a utilizar no combate ao oídio da videira e para a implementação de estratégias anti resistência, de forma a minimizar o aparecimento de estirpes resistentes e a preservar a eficácia dos produtos fitofarmacêuticos.

Palavras-chave: videira, oídio, fungicidas, modo de ação, eficácia, resistência.

1- INTRODUÇÃO

A resistência ou falta de sensibilidade de um fungo a um fungicida, é um processo que ocorre naturalmente numa população, em que alguns dos seus indivíduos adquirem a capacidade de sobreviver à aplicação de um produto fitofarmacêutico a que anteriormente eram sensíveis e de transmitir essa capacidade à sua descendência (EPPO, 1988).

O risco de desenvolvimento de resistência depende de fatores inerentes à substân-

⁽¹⁾ DGAV – Quinta do Marquês, 2780 – 155 Oeiras, Portugal assuncaoпрates@dgav.pt

⁽²⁾ DGAV – Quinta do Marquês, 2780 - 155 Oeiras, Portugal miriamcavaco@dgav.pt

cia ativa (maior risco para os produtos com modo de ação bioquímico específico, longa persistência de ação e rápida metabolização), ao patogéneo (maior risco para patogéneos com ciclos de vida curtos e numerosos, com esporulação abundante, dispersão aérea e grande variabilidade genética) e ao uso do fungicida, o designado risco agrônomico (dose, número e técnica de aplicação, tipo de cultura, rotações, sensibilidade das cultivares, práticas culturais e fitossanitárias, localização geográfica e ambiental) (EPPO, 2015).

No caso do oídio da videira, o risco associado ao patogéneo *E. necator*, é classificado de médio risco de desenvolvimento de resistência para o FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) e de elevado risco para a EPPO (*Mediterranean Plant Protection Organization*).

O risco de resistência associado ao fungicida é avaliado, durante o processo de autorização de venda do produto fitofarmacêutico, sendo estabelecidas as condições de utilização do produto, modificadores do risco agrônomico, que reduzem a pressão de seleção sobre o patogéneo e o potencial risco de desenvolvimento de resistência, como por exemplo, o número máximo de tratamentos, por ciclo cultural. Estes modificadores do risco de resistência são a base das estratégias de gestão da resistência ou estratégias anti resistência, fundamentais para a preservação da eficácia dos produtos fitofarmacêuticos.

Neste trabalho, os fungicidas anti oídio da videira são caracterizados segundo o seu modo de ação (MOA), a atividade biológica, a mobilidade na planta, a persistência de ação, indicando-se o risco de resistência de acordo com o FRAC e as limitações impostas para uma gestão adequada do risco de resistência em Portugal.

2 - FUNGICIDAS ANTI - OÍDIO

Os fungicidas anti oídio foram classificados em: inorgânicos, inibidores da respiração, inibidores da transdução dos primeiros sinais celulares, inibidores da biossíntese dos esteróis e modo de ação desconhecido.

2.1 – Inorgânicos

Existem dois fungicidas inorgânicos, o enxofre e o hidrogenocarbonato de potássio (Quadro 1). O enxofre é um fungicida de superfície, que atua em vários locais de ação do metabolismo dos fungos (multi sítio). Inibe a respiração celular (em várias etapas da cadeia respiratória), a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos. O enxofre, para se tornar biologicamente ativo, tem de passar ao estado gasoso, sendo para isso importante a luminosidade e temperaturas entre 20-25°C. Podem ocorrer sintomas de fitotoxicidade com temperaturas elevadas, superiores a 30°C. O enxofre inibe a germinação dos esporos (atividade preventiva), o crescimento do micélio (atividade curativa) e a formação dos esporos (anti esporulante). Tem uma persistência biológica de 10 a 12 dias, é lixiviado pelas chuvas e possui baixo risco de desenvolvimento de resistência, pertence ao grupo FRAC com o código M2.

O hidrogeno carbonato de potássio é um fungicida de superfície. O seu modo de ação está associado a alterações do pH, da pressão osmótica e ao balanço de iões bicar-

bonato/carbonato, em fungos sensíveis. Inibe a germinação dos esporos (atividade preventiva) e o crescimento do micélio (atividade curativa). A sua persistência biológica é de 7 a 10 dias e é lixiviado por chuvas superiores a 20 mm. Podem ocorrer sintomas de fitotoxicidade se as aplicações forem realizadas com temperaturas elevadas (superiores a 30°C). Devido ao seu modo de ação, multi sítio, o risco de desenvolvimento de resistência é baixo, pertence ao grupo FRAC com o código NC.

Quadro 1 - Fungicidas anti oídio para a videira. Fungicidas inorgânicos, substâncias ativas, risco de resistência, número máximo de tratamentos por mecanismo de ação e código FRAC.

MOA	Mecanismo de ação	Grupo Químico	Substância ativa	Risco de Resistência	Nº Máximo tratamentos	Código FRAC
Multi sítio	Actua em diversos enzimas	Inorgânico	enxofre	Baixo	--	M 2
Não classificado	desconhecido	Inorgânico	hidrogenocarbonato de potássio	Baixo	--	NC

2.2 – Inibidores da respiração

Existem vários fungicidas anti oídio inibidores da respiração, agrupados segundo o mecanismo de ação: SDHI (*Succinate dehydrogenase inhibitors*), QoI (*Quinone outside inhibitors*) e inibidor da fosforilação oxidativa (Quadro 2).

No grupo dos SDHI estão os fungicidas boscalide e fluopirame, inibidores da respiração na cadeia de transporte de electrões na mitocondria, inibindo a enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDHI) e bloqueando o transporte de eletrões no complexo II da cadeia respiratória. Afetam a produção de energia, o catabolismo dos glúcidos, aminoácidos e lípidos.

O boscalide, é um fungicida sistémico, possui mobilidade translaminar e acropétala (para as extremidades das folhas), enquanto que o fluopirame é penetrante, com mobilidade translaminar. O boscalide, inibe a germinação dos esporos, o crescimento do tubo germinativo, a formação do apressório (atividade preventiva) e inibe o crescimento do micélio (atividade curativa) (STAMMLER *et al.*, 2008). O fluopirame inibe a germinação dos esporos, o crescimento do tubo germinativo (atividade preventiva) e o crescimento do micélio (atividade curativa). Ambos possuem uma persistência biológica de 12 a 14 dias.

Existe resistência cruzada entre os fungicidas do grupo SDHI, pertencentes ao grupo FRAC com o código 7. Os SDHI apresentam médio a elevado risco de resistência e estão limitados a 3 tratamentos, no conjunto das doenças (oídio e podridão cinzenta).

No combate ao oídio, o boscalide está autorizado em mistura com o cresoxime metilo (SDHI+QoI), em tratamentos até ao pintor e o fluopirame em mistura com o tebuconazol (SDHI+DMI), em tratamentos até ao fecho dos cachos.

Os fungicidas QoI (anteriormente chamados de estrobilurinas), autorizados para o oídio da videira, são fungicidas de largo espectro de ação, que inibem a respiração mitocondrial dos fungos, no complexo III (citocromo bc1), impedindo a transferência de electrões, fixando-se na face externa do citocromo b. Inibem a germinação dos esporos (atividade preventiva), o crescimento do micélio (atividade curativa) e a formação dos esporos (anti esporulante). Penetram nos tecidos da planta, apresentam mobilidade translaminar e alguns têm ação de vapor. A persistência biológica é de 12 a 14 dias. Os QoI pertencem ao grupo FRAC com o código 11, possuem elevado risco de resistência, que se desenvolve rapidamente e com acentuadas quebras de eficácia, nomeadamente se ocorrer a mutação G143A (BAUDOIN et al., 2008; DUFOUR et al., 2011). Existe resistência cruzada entre os fungicidas do grupo QoI, por isso, no conjunto dos QoI podem realizar-se no máximo 3 tratamentos anuais, no conjunto das doenças (escoriose, mildio, oídio e black rot). Na monitorização realizada em 2013, a nível Europeu, foi divulgada pela primeira vez, a resistência de populações portuguesas de *Erysiphe necator* aos QoI (FRAC, 2013).

Em França, a resistência do *Erysiphe necator* aos QoI surgiu pela primeira vez em 2008, com implicações de quebras de eficácia no campo em 2009 e 2010. Em situações de 10% de fenótipos resistentes, ao realizar duas aplicações com QoI, as quebras de eficácia registadas foram de 40 a 50%, o que levou à autorização dos QoI, apenas em mistura com fungicidas que ainda não apresentassem problemas de resistência (MOURANX et al., 2012).

O meptildinocape, produto orgânico de síntese (derivado do fenol), é um fungicida de superfície, actua na produção de energia (nomeadamente no desdobramento da fosforilação oxidativa) e é específico para o oídio. Tem atividade preventiva e curativa. A sua persistência biológica é inferior à do enxofre (cerca de 10 dias) e tem baixo risco de resistência, pertence ao grupo FRAC com o código 29.

Quadro 2 - Fungicidas anti oídio para a videira. Grupos de fungicidas inibidores da respiração, grupos químicos, substâncias ativas, risco de resistência, número máximo de tratamentos por mecanismo de ação e código FRAC.

MOA	Mecanismo de ação	Grupo Químico	Substância ativa	Risco de Resistência	Nº Máximo tratamentos	Código FRAC
C - Inibidores da respiração	C2: Complexo II SDHI (<i>Succinate dehydrogenase inhibitors</i>)	Carboxamida Benzamida-piridina	boscalide fluopirame	Médio a Elevado	3	7
	C3: Complexo III citocromo bc1 QoI (<i>Quinone outside inhibitors</i>)	Metoxiacrilato Metoxiacrilato Metilmetoxicarbamato Oximinoacetato	azoxistrobina cresoxime-metilo piraclostrobina trifloxistrobina	Elevado	3	11
	C5: Interrompe a fosforilação oxidativa	Derivado do fenol	meptildinocape	Baixo	--	29

2.3 - Inibidores da transdução dos primeiros sinais celulares

A quinoxifena e a proquinazida pertencem ao mesmo grupo de resistência cruzada os AZN (azanaftalenos) (Quadro 3).

O mecanismo de ação da quinoxifena e da proquinazida ainda não foi identificado, no entanto, julga-se estar relacionado com a transdução dos primeiros sinais celulares, entre o patogêneo e o hospedeiro, necessário à infecção (CRANE *et al.*, 2007). Ambos inibem o crescimento do tubo germinativo e a formação do apressório (atividade preventiva). A quinoxifena e a proquinazida são fungicidas penetrantes, com mobilidade translaminar e redistribuição sob a forma de vapor à volta da zona tratada, a proquinazida tem maior difusão que a quinoxifena. Ambos resistem à lavagem pelas chuvas ocorridas uma hora após a aplicação. A quinoxifena tem uma persistência biológica de 10 a 12 dias e a proquinazida de 12 a 14 dias.

O FRAC classifica os AZN como de médio risco de resistência. Existe resistência cruzada entre a quinoxifena e a proquinazida, pelo que, pertencem ao mesmo grupo FRAC com o código 13. Estes dois fungicidas foram limitados a um número máximo de 3 aplicações anuais com quinoxifena ou proquinazida, não se devendo aplicar mais do que 2 tratamentos consecutivos. Esta limitação também se aplica à mistura de quinoxifena com miclobutanil (AZN+DMI) e de proquinazida com tetraconazol (AZN+DMI). De referir que não existe resistência cruzada entre os AZN e os QoI e os DMI (adiante mencionados).

Quadro 3 - Fungicidas anti oídio para a videira. Fungicidas que interferem na transdução do sinal, grupos químicos, substâncias ativas, risco de resistência, número máximo de tratamentos por mecanismo de ação e código FRAC.

MOA	Mecanismo de ação	Grupo Químico	Substância ativa	Risco de Resistência	Nº Máximo tratamentos	Código FRAC
E - Mecanismo de transdução de sinal	E1: Transdução de sinal (mecanismo desconhecido) AZN (azanaftalenos)	Quinolina Quinazolinona	quinoxifena proquinazida	Médio	3	13

2.4 – Inibidores da biossíntese dos esteróis

Existem dois grupos químicos de fungicidas, autorizados para o controlo do oídio da videira, pertencentes ao grupo dos inibidores da biossíntese dos esteróis (IBE). O grupo, dos que inibem a biossíntese dos esteróis na demetilação (DMI), mais precisamente em C₁₄ (triazóis e pirimidina) e que são de médio risco de desenvolvimento de resistência e outro, que atua em fases posteriores na $\Delta 7$ - $\Delta 8$ isomerase e $\Delta 14$ redutase (espiroxamina) (Quadro 4).

Os DMI atuam na formação do tubo germinativo (atividade preventiva) e na formação dos haustórios (atividade curativa). São fungicidas sistêmicos, com mobilidade reduzida, ascendente e variável com a molécula, resistentes à lavagem pela chuva e com uma persistência de ação de 12 a 14 dias. Existe resistência cruzada entre os fungicidas DMI, pertencentes ao grupo FRAC com o código 3, por isso, no conjunto dos DMI podem realizar-se no máximo 3 aplicações anuais, posicionados até ao fecho dos cachos (GOMES DA SILVA *et al.*, 2001).

A espiroxamina inibe a formação do tubo germinativo, a fixação do apressório (atividade preventiva) e inibe a formação dos haustórios, o crescimento do micélio e a formação dos conidióforos (atividade curativa). Possui mobilidade ascendente, resistência à lavagem pela chuva caída 1 a 2 horas após a aplicação e uma persistência de 10 a 12 dias. A espiroxamina pertence ao grupo FRAC com o código 5 e não apresenta resistência cruzada com os DMI, estando limitada a 3 aplicações anuais.

Existem diversas misturas de DMI com outros fungicidas pertencentes a outros grupos de risco de desenvolvimento de resistência, nomeadamente QoI e SDHI. Uma vez que as misturas não previnem o aparecimento de indivíduos resistentes, apenas previnem a sua dispersão, o número máximo de tratamentos estabelecido por grupo de resistência deve ser seguido.

A resistência do *Erysiphe necator* aos DMI e aos QoI é diferente. No caso dos DMI, a resistência é de origem poligénica, com vários mecanismos de resistência envolvidos, com uma evolução gradual, até atingir uma situação de falta de eficácia prática, enquanto a resistência aos QoI é de rápida evolução e traduz-se rapidamente em quebras de eficácia no campo.

Em França, são conhecidos dois génotipos distintos de *Erysiphe necator* (A e B) e tanto a resistência aos DMI como aos QoI parece estar relacionada com a presença do génotipo B, dominante após o vingamento (DUFOUR *et al.*, 2011). Neste caso, os tratamentos com QoI e DMI são tanto mais selectivos para a resistência quanto mais tardios.

Quadro 4 - Fungicidas anti oídio para a videira. Fungicidas que inibem a biossíntese dos esteróis, grupos químicos, substâncias ativas, risco de resistência, número máximo de tratamentos por mecanismo de ação e código FRAC.

MOA	Mecanismo de ação	Grupo Químico	Substância ativa	Risco de Resistência	Nº Máximo tratamentos	Código FRAC
G: Biossíntese dos esteróis (IBE)	G1: inibidores da demetilação em C ₁₄ (DMI) (IBE classe 1)	Triazol	fenebuconazol, flusilazol, fluquinconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, tebuconazol, tetraconazol	Médio	3	3
		Pirimidina	fenarimol			
	G2: inibidores da Δ_7 - Δ_8 isomerase e Δ_{14} redutase (IBE classe 2)	Espiroquetalamina	espiroxamina	Baixo a Médio	3	5

2.4 - Modo de ação desconhecido

Existem três substâncias ativas anti-oídio cujo modo de ação ainda é desconhecido, a ciflufenamida, a metrafenona e a piriofenona, todas elas com médio risco de desenvolvimento de resistência (Quadro 5). A ciflufenamida é uma substância fungicida que inibe o crescimento do tubo germinativo (atividade preventiva), a formação e o desenvolvimento dos haustórios, o crescimento do micélio-hifas secundárias (atividade curativa), e a formação de conidióforos (anti esporulante). Não inibe a germinação dos esporos nem a formação dos apressórios. Possui mobilidade translaminar e ação de vapor (SANO *et al.*, 2007). Tem resistência à lavagem pela chuva caída até 2 horas após a aplicação e uma persistência de ação de 12 a 14 dias, devendo ser reduzida para 10 a 12 em situações de maior pressão da doença. A ciflufenamida apresenta médio risco de desenvolvimento de resistência, pertence ao grupo com o código FRAC U6 e encontra-se autorizada isoladamente e em mistura com o difenoconazol (DMI); em qualquer das situações, como estratégia de gestão do risco de resistência, foi limitada a no máximo 2 aplicações anuais, no conjunto dos produtos que contêm ciflufenamida,

A metrafenona e a piriofenona, ao que tudo indica, têm um modo de ação similar. O seu mecanismo de ação bioquímico ainda é desconhecido, pensa-se que esteja relacionado com a interrupção da actina. Atuam sobre a germinação dos conídios e formação do apressório - apressórios deformados (atividade preventiva), atuam ao nível da morfologia das hifas, inibindo o crescimento do micélio (atividade curativa) e inibem a formação dos conidióforos afetando a esporulação (anti esporulante) (NAVE *et al.*, 2007). Penetram nos tecidos da planta e movem-se via xilema até à margem da folha, com difusão sob a forma de vapor; são resistentes à lavagem pela chuva, em chuvas ocorridas 1 hora após a aplicação. Conferem uma persistência de ação de 12 a 14 dias.

Existe resistência cruzada entre a metrafenona e a piriofenona, pelo que pertencem ao mesmo grupo FRAC com o código U8. Logo, a estratégia de gestão da resistência é conjunta, isto é, poderão ser efectuados no máximo 3 tratamentos por campanha, no conjunto dos fungicidas que contenham metrafenona e piriofenona. Esta limitação também se aplica à mistura de piriofenona com tebuconazol (DMI). De referir que a metrafenona e a piriofenona não possuem resistência cruzada com os DMI e QoI, isto é, as estirpes resistentes à metrafenona e piriofenona são sensíveis aos DMI e QoI (KUNOVA *et al.*, 2015).

Quadro 5 - Fungicidas anti oídio para a videira. Modo de ação (MOA) desconhecido, grupos químicos, substâncias ativas, risco de resistência, número máximo de tratamentos por mecanismo de ação e código FRAC.

MOA	Mecanismo de ação	Grupo Químico	Substância ativa	Risco de Resistência	Nº Máximo tratamentos	Código FRAC
U - Modo de ação desconhecido	desconhecido	fenilacetamida	ciflufenamida	Médio	2	U6
	Inibidores da actina (proposto)	benzofenona	metrafenona	Médio	3	U8
		benzollpiridina	piriofenona			

3 - ESTRATÉGIA DE PROTECÇÃO

A proliferação de substâncias ativas com o mesmo modo de ação, pertencentes ao mesmo grupo de resistência cruzada, como aconteceu com os DMI, QoI e mais recentemente com os SDHI, e, por último, o aparecimento de diversas misturas de fungicidas, com diferentes grupos de resistência cruzada, tem um grande impacto em termos de gestão da resistência. Para se poder implementar uma estratégia de gestão do risco de resistência, é imprescindível o conhecimento dos grupos de resistência cruzada e das substâncias ativas que os compõem.

De um modo geral, a utilização de misturas com diferentes modos de ação e a alternância de fungicidas com diferente modo de ação, de diferentes grupos de resistência cruzada, são ambas estratégias aceitáveis de gestão da resistência. Contudo, em qualquer das situações, deve ser utilizado apenas o limite máximo de tratamentos estabelecido para cada grupo de resistência, de forma a minimizar o aparecimento de estirpes resistentes e preservar a eficácia dos produtos fitofarmacêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUDOIN, A., OLAYA, G., COLCOL, J., SIEROTZKI, H. 2008. QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the mid-Atlantic United States. *Plant Health Progress*. February (2008): 0211-02.
- DUFOUR, M., FONTAINE, S., MONTARRY, J. & CORIO-COSTET, M. 2011. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci*.67: 60-69.
- EPPO. 1988. Fungicide resistance: definitions and use of terms. *Bulletin OEPP/EPPO* 18, 569-574. EPPO. 2015. Resistance Risk Analysis. EPPO Standard PP1/213(4). *Bulletin OEPP/EPPO* 45 (3), 371-387.
- FRAC. 2013. *Minutes of the 2013 QoI Meeting, recommendations for 2014*. December 11th, 2013.
- GOMES DA SILVA, M.T., ALVES, J.A., PEREIRA, A.P., STEVA, H. & CAZENAVE, C. 2001. Eficácia e efeito de selecção de tratamentos com azoxistrobina no combate ao oídio da videira. 5º Simpósio de vitivinicultura do Alentejo. I (153-160)
- MAURANX, P. & STEVA, H. 2012. Efficacité sur l'oidium de la vigne (*Erysiphe necator*) de programmes de lute en presence de phenotypes resistents aux QoI. APPP. *10e Conference Internationale sur les maladies des plantes*.

- KUNOVA, A. PIZZATTI, BONALDI, M. & CORTESI, P. 2015. Metrafenone resistance in a population of *Erysiphe necator* in northern Italy. *Pest Manag Sci.* 2016 Feb; 72(2):398-404.
- NAVE, B.T., KOEHLE, H., KOGEL, K.-H. & OPALSKI, K. 2007. The mode of action of metrafenone. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V, 15th International Reinhardsbrunn Symposium.* pp 39-44.
- SANO, S., KASAHARA, I. & YAMANAKA, H. 2007. Development of a novel fungicide, cyflufenamid. *J. Pestic. Sci.*, 32 (2), 137-138.
- STAMMLER, G.; BRIX, H.D.; NAVE, B.; GOLD, R. & SCHOEFL, U. 2008. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V, 15th International Reinhardsbrunn Symposium.* pp 45-51.

POTENCIAL DE INTERAÇÃO ENTRE PODA E FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA E A INCIDÊNCIA DE COCHONILHAS ASSOCIADAS À VINHA: EFEITO CUMULATIVO DE 4 ANOS

Elsa Borges da SILVA¹; Marta MAIA, Patrícia LOPES, Maria SANTOS, Amândio CRUZ², Manuel BOTELHO², José Carlos FRANCO¹, Henrique RIBEIRO², António MEXIA²

O potencial de interação entre práticas culturais e importância relativa de pragas, nomeadamente ao nível do tipo de poda e da incorporação de fertilizantes orgânicos, foi alvo de estudo no âmbito do projeto “FertilPoda” (Proder, PA 24071), durante 4 anos, no caso particular da cochonilha-lapa associada à vinha em Portugal. São apresentados os principais resultados da avaliação dos efeitos do tipo de poda (poda manual vs poda mecânica em sebe), bem como da variação de diversos fertilizantes orgânicos incorporados (estrupe bovino, resíduos sólidos urbanos compostados, lamas de ETAR, biocarvão), na percentagem e dinâmica de infestação da cochonilha durante o ano e na avaliação à colheita. Foi, igualmente, possível esclarecer vários aspetos da bioecologia da cochonilha-lapa ainda desconhecidos (i.e., ciclo de vida, ciclo biológico, tipo de reprodução, existência de parasitismo).

Palavras-chave: bioecologia, ciclo de vida, cochonilhas-lapa, dinâmica de infestação, parasitoides, *Parthenolecanium corni*, práticas culturais.

RESUMO ALARGADO

Podem ser vários os fatores que podem alterar a importância relativa das pragas, sendo frequentemente referido que, ao nível dos fatores abióticos, as alterações climáticas e/ou alterações das práticas culturais podem ser responsáveis pelo acréscimo da densidade populacional e por desequilíbrios na relação espécie fitófaga/hospedeiro vegetal, resultando no acréscimo de prejuízos. De facto, alterações ao nível do microclima das plantas podem favorecer o desenvolvimento dos insetos mediante a manutenção de temperatura e humidade favoráveis, muitas vezes em conjugação com maior fornecimento de nutrientes à cultura. Este potencial de interação entre práticas culturais e importância relativa de pragas, nomeadamente ao nível do tipo de poda (manual, mecânica em sebe) e da incorporação de fertilizantes orgânicos (estrupe bovino, resíduos sólidos urbanos compostados, lamas de ETAR, biocarvão, testemu-

¹ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal

² Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal
Autor correspondente: elsasilva@isa.ulisboa.pt

nha) tem sido alvo de estudo no âmbito do projeto “FertilPoda” (Proder, PA 24071), no caso particular das cochonilhas-lapa associadas à vinha em Portugal.

O período experimental decorreu de 2012-2015, em vinhas da casta Syrah, na Qta. Gradil (Cadaval) e Qta. Côro (Sardoal), tendo-se procedido à determinação: a) percentagem de infestação por qualquer estágio de desenvolvimento da cochonilha-lapa (3 zonas videira/3 videiras/modalidade); b) dinâmica populacional (estádio de desenvolvimento/órgão, nomeadamente sarmento, folha basal, folha oposta ao 1ºcacho, 1ºcacho, folha media, 2ºcacho, folha apical); c) percentagem de cachos com presença da cochonilha à colheita. Paralelamente, durante o mesmo período, procedeu-se à recolha de espécimes de cochonilhas/local para identificação taxinómica e a manutenção de colónias de cochonilhas em laboratório até emergência de parasitoides.

Paralelamente, foram realizados dois ensaios em laboratório (2012, 2015), com recurso a infestação artificial de cochonilha-lapa, em videiras envasadas das castas Syrah e Aragonez, em condições controladas ($22\pm 2^\circ\text{C}$, $60\pm 10\%$ hr, $14\pm 1\text{L}:10\pm 1\text{E}$), com o objetivo de conhecer com exatidão: a) ciclo de vida (estádios de desenvolvimento, dimensões e morfologia externa); b) ciclo biológico (n° gerações/ano); c) tipo(s) de reprodução associado(s).

O primeiro resultado em relação à identificação da cochonilha-lapa associada à vinha confirmou a hipótese inicial de ser *Parthenolecanium corni* (Bouché) (Hemiptera: Coccidae). Os parasitoides *Coccophagus lycimnia* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae) e *Metaphycus dispar* (Mercet) (Hymenoptera: Encyrtidae) foram identificados como associados a *P. corni*.

Com base nos resultados dos ensaios de laboratório e das observações de campo, foi possível propor, pela 1ª vez, a sequência do ciclo de vida, i.e. *P. corni* desenvolve 3 instares ninfais antes da fêmea adulta e 2 instares ninfais, seguidos de pupa antes da emergência do macho adulto. Assim, no inverno, esta espécie permanece, durante o 2/3º instar (fêmea) e pupa (macho), somente no cordão principal da videira por baixo do ritidoma. Em finais de março, ocorre reprodução sexuada e, em finais de maio, as ninfas de 1º instar começam a colonizar a rebentação. No início do verão, inicia-se novo ciclo de reprodução e, no início do outono (senescência da videira), ocorre a migração de ninfas 1/2º instar para o cordão principal da cepa, sendo difícil a sua deteção devido ao local de abrigo e à coloração semelhante à do ritidoma. Quanto ao tipo de reprodução, pode-se inferir que *P. corni* apresenta reprodução sexuada, em todo o ano, se não exclusivamente, pelo menos de modo facultativo. Foi possível constatar que fecundidade das fêmeas, sujeitas a reprodução sexuada, é elevada (ca. 900 ovos).

Quanto ao ciclo biológico, com base nas informações disponíveis, pode-se afirmar que na região Centro de Portugal Continental existem condições para o desenvolvimento de duas gerações/ano.

A poda mecânica em sebe provocou acréscimo significativo da intensidade de *P. corni*, por comparação com a poda manual, em termos da percentagem de infestação por qualquer estágio de desenvolvimento, logo após um ano de utilização deste tipo de poda (sendo que a cochonilha-lapa já encontrava instalada nas vinhas), em ambas as parcelas testadas. Esta influência foi potenciada quando o número de anos de prática desta modalidade aumentou. Por outro lado, o efeito da incorporação de fertilizantes orgânicos no acréscimo da importância de *P. corni* não se mostrou evidente e consis-

tente, tendo ocorrido variações várias, nas condições de realização dos ensaios e com os fertilizantes orgânicos testados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela União Europeia e pelo Governo de Portugal, através do programa ProDeR, Medida 4.1 “Cooperação para a Inovação” (projeto nº PA 24071/Parceria 397, FertilPoda) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (projeto nº UID/AGR-00239/2013). Os exemplares de parasitóides foram identificados pelo Dr. George Jasposhvil (Entomology and Biocontrol Research Centre/ Agriculture University of Georgia).

TRICHODERMA ATROVIRIDE STRAIN I-1237: COLONIZATION OF PRUNING WOUNDS AND ANTAGONISM ACTION AGAINST GRAPEVINE WOOD DISEASE

Pedro REIS¹; Cecília REGO¹

SUMMARY

On grapevine, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoconiella chlamydospora* are responsible for Botryosphaeria dieback and Grapevine leaf stripe disease, respectively. These trunk diseases are of major importance worldwide. They are associated with wood necrosis but they are also able to infect both young and mature tissues as well as green shoots, causing brown cankers. A trial was conducted in two different vineyards, in Portugal, in order to test a formulation of *Trichoderma atroviride* strain I-1237, under the local environmental conditions. The effectiveness of the treatments was evaluated through the ability to reduce artificial infections of pruned grapevine canes by the fungi. The trial was conducted successfully under local environmental conditions and according to the protocol established. The biofungicide showed a good control of incidence on the artificial infections of both pathogens, while concerning severity, the effect was high for *Phaeoconiella chlamydospora* and very high for *Neofusicoccum parvum*. Reisolation percentages of positive control ranged from 68% to 89% in *Phaeoconiella chlamydospora* and *Neofusicoccum parvum*, respectively. Colonization by *Trichoderma atroviride* was present and recorded in different levels of the canes. In conclusion, *Trichoderma atroviride* strain I-1237 (ESQUIVE®, Agrauxine) can be regarded an efficient Biological Control Agent for wound protection of grapevine pruned canes against both fungi under study.

Key words: *Vitis vinifera*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, biofungicide, pruning wounds.

1 - INTRODUCTION

Grapevine trunk diseases are of major importance for the wine industry worldwide. Over the last 15 years, an increase in the incidence of these diseases has been reported worldwide (BERTSCH *et al.*, 2012; GROSSMAN & DOUBLET, 2012; CHIARAPPA, 2000; GRANITI *et al.*, 2000; BRUEZ *et al.*, 2013; SOSNOWSKI *et al.*, 2007) which constitutes a major threat for the main vine-growing regions of

⁽¹⁾ Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

the southern and northern hemispheres (MUGNAI *et al.*, 1999; ARMENGOL *et al.*, 2001; EDWARDS & PASCOE, 2004; GIMENEZ-JAIME *et al.*, 2006). Two of these grapevine trunk diseases are Botryosphaeria dieback and Grapevine leaf stripe disease (GLSD) caused by the fungi *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoconiella chlamydospora*.

Several *Botryosphaeriaceae* species are associated with Botryosphaeria dieback (MOLLER & KASIMATIS 1978; LARIGNON & DUBOS 1997; GRANITI *et al.*, 2000; FISCHER 2006; LARIGNON *et al.*, 2009; ÚRBEZ-TORRES 2011; SPAGNOLO *et al.*, 2014a; LARIGNON *et al.*, 2015), being the most common species isolated from grapevines around the world *Diplodia seriata* De Not. (CRISTINZIO, 1978; ROVESTI & MONTERMINI, 1987; LARIGNON *et al.*, 2001; CASTILLO-PANDO *et al.*, 2001; PHILLIPS *et al.*, 2007; SAVOCCHIA *et al.*, 2007; ÚRBEZ-TORRES *et al.*, 2008) and *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (CROUS *et al.*, 2006). Grapevine disease symptoms caused by these fungi include leaf spots, fruit rots, shoot dieback, bud necrosis, vascular discoloration of the wood and perennial cankers (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

Leaf stripe disease, one of the diseases within the esca complex (SURICO *et al.*, 2008), is caused by *Phaeoconiella chlamydospora* which is also associated with necrotic lesions in the wood of esca and Petri disease affected vines, including brown spots and streaking in the xylem vessels (ELENA *et al.*, 2015). The leaf stripe form of esca is characterised by the presence of leaves showing green to chlorotic areas turning to necrotic spots between the veins along the margins (SPARAPANO *et al.*, 2001; FELICIANO *et al.*, 2004; MAGNIN-ROBERT *et al.*, 2011). These discoloured areas usually coalesce, giving the leaves a “tiger-striped” appearance, hence the name of this severe form of esca disease. This results in a reduction of the quantity of grape yield (BERTSCH *et al.*, 2013) and a compromise on the quality of the grapes due to uneven ripening (MUGNAI *et al.*, 1999; CALZARANO *et al.*, 2014) which will affect the alcohol content and the flavour components of wine (MUGNAI *et al.*, 1999; Calzarano *et al.*, 2001, 2009; PASQUIER *et al.*, 2013; CLOETE *et al.*, 2015).

Despite the diversity of these taxonomically unrelated trunk pathogens, they follow an almost similar disease cycle infecting vines through wounds, being pruning wounds the most important ports of entry (PETZOLDT *et al.*, 1981; CHAPUIS *et al.*, 1998; VAN NIEKERK *et al.*, 2011; MUTAWILA *et al.*, 2015). One of the major control methods is to protect these wounds by pruning wound treatments (chemical or biocontrol agents), although the large diversity of GTDs pathogens makes it difficult for one single method to effectively control all trunk diseases complex (MUTAWILA *et al.*, 2015). Since sodium arsenite, once considered the most effective fungicide for the control of esca (MUGNAI *et al.*, 1999; SURICO *et al.*, 2008) was removed from the market due to environmental and human toxicity (SURICO *et al.*, 2008), other fungicides such as sterol demethylation inhibitors (flusilazole and myclobutanil) have been reported to be effective, to some extent (MUTAWILA *et al.*, 2015). One of the major problems with these chemical fungicides is that their efficacy on the pruning wounds is short-lived, and the wounds remain susceptible until they are fully healed which takes a period of at least 4-16 weeks depending on the time of pruning (LARIGNON & DUBOS, 2000; VAN NIEKERK *et al.*, 2011). Therefore multiple applications of fungicides would be

required to achieve a longer period of control (MUNKVOLD & MAROIS, 1993a). Biocontrol agents (BCA) that colonise the wounds may hence provide a longer protection. MUNKVOLD & MAROIS (1993b) showed that the protection provided by these agents was always better when the pathogen inoculation was carried out several days after the application, although the time needed for wound colonisation may create a period of susceptibility to infection by trunk pathogens (MUTAWILA *et al.*, 2015)

Due to the importance of finding new and more effective solutions against GTDs, in this study a trial was conducted in 2013 and 2014 in two different vineyards, in Portugal, in order to test ESQUIRE®, a formulation of *Trichoderma atroviride* strain I-1237, as a biocontrol agent, under the local environmental conditions. Our goal was to evaluate the potential of the treatments through the ability to reduce artificial infections of pruned grapevine canes by the fungi, in order to assess the ability of the BCA to colonise the wounds and to protect them against two different grapevine wood pathogens, *N. parvum* and *P. chlamydospora*.

2 - MATERIAL AND METHODS

These trials were conducted in two different vineyards, in different regions of Portugal. In 2013, the trial was conducted in a 17 years old vineyard cv. Pinot Noir located about 60 km from Lisbon in Alenquer, Estremadura region (center west of Portugal). For the 2014 trial, a 15 years old vineyard cv. Aragonez (=Tempranillo) located about 260 km from Lisbon in Estremoz, Alentejo region (center south of Portugal) was selected. These two vineyards were selected due to being located in two regions with different Köppen-Geiger climate classification. The Alenquer region has a classification of Csb (“Coastal Mediterranean”) which is characterized by a cooler summer, whereas the Estremoz region has a classification of Csa (Interior Mediterranean) with a significantly hotter summer.

For both trials one year old shoots with similar appearance, namely length, internodes and buds, were selected for inoculation/treatment. These shoots were pruned at 2 cm above the third bud (>20 cm shoot length). A total of five treatments were set up on grapevines in a CRD (“Completely Randomized Design”) with 30 repetitions per treatment, making a total of 150 shoots used for each trial (“elementar unit – one plant”). Treatments (spray application) were carried out after pruning on February 2013 and February 2014 by spraying the pruning wounds during favourable weather conditions, namely cloudy, humid and temperature around 15°C. The BCA under study, ESQUIRE®, was offered in a WP (wetable powder) formulation containing 100 million UFC/g of *Trichoderma atroviride*. It was weighted and mixed with water on a spray bottle with a concentration of 27g/l. The bottles were shaken before use and the application took place immediately after pruning, fully covering the shoot wound. Treatments were followed by inoculation with the selected pathogens, in which one droplet of 40 µl spores solution was placed on each wound using a micropipette. For each pathogen, one local strain was selected in order to prepare a conidial suspension in sterile distilled water (sdw) at a concentration of 105 conidia ml⁻¹. For *P. chlamydospora*, Erlenmeyer flasks containing 250 ml of Potato Dextrose Broth

(Difco, BD, Sparks, MD, USA) were inoculated with 3 mm diameter agar plugs removed from the edge of colonies growing in the dark at 20°C. Flasks were then placed in an Edmund Brühl reciprocal shaker (90 stroke min⁻¹) for 14 days, in the dark. Liquid cultures were filtrated to remove any mycelia fragments and diluted with sdw to reach the desired concentration (105 spores ml⁻¹). For *N. parvum*, Petri dishes containing 15 ml of 2% Agar medium (Difco, BD, Sparks, MD, USA) with pine needles were inoculated with 3 mm diameter plugs cut from the edge of actively growing colonies, and incubated under NUV, at 25°C. After 10 – 20 days spores were removed from pycnidia and placed in sdw to obtain a conidial suspension with the desired concentration (105 spores ml⁻¹). After inoculation, shoot wounds were protected immediately for one week using Parafilm M®, to prolong the humidity around the inoculated wound. Treatments, application, product, concentration, inoculation and spore solution volume are described in Table 1.

Table 1 - Treatments, application time, product, concentration, inoculation and spore solution volume carried out in 2013 and 2014

Treatments	Application time	Product	Product concentration	Inoculation	Spore solution volume (µl) ^d
1	-	not treated	-	-	-
				(negative control)	
2	-	not treated	-	artificial infection Pch ^b	40
				(positive control)	
3	-	not treated	-	artificial infection Np ^c	40
				(positive control)	
4	after pruning	ESQUIVE	27g/l ^a	artificial infection Pch ^b	40
5	after pruning	ESQUIVE	27g/l ^a	artificial infection Np ^c	40

^a - 4kg/ha with 150l of water/ha; ^b - Pch - *Phaeoconiella chlamydospora*; ^c - Np - *Neofusicoccum parvum*; ^d - 1 day after pruning.

Assessments were made during October and the incidence and severity of diseases were recorded. Three different levels of the shoots were analyzed, being level 1, just below the second bud, level 2, just below the third bud and level 3, just below the cut.

For re-isolation the bark of each shoot was removed in order to reduce the incidence of saprophyte fungi and the three levels were analyzed. For each level four pieces of wood were removed from the border of necrotic internal tissue, immersed in a 7% hypochlorite solution and rinsed in sterilized distilled water. Fragments were then plated onto PDA amended with chloramphenicol (250mg/l) (REGO et al., 2005), which did not inhibit the growth of *Trichoderma atroviride* in the reisolation dishes.

All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and treatment means compared by using Duncan's test at a 5% significance level (STATISTICA 6.0). Percentages were transformed to arcsine-square root values before analyses.

3 - RESULTS

In the Alenquer trial in 2013, results obtained for *P. chlamydospora* incidence revealed that artificial infection of ESQUIVE® + *P. chlamydospora* (23.3%) differ

significantly from *P. chlamydospora* positive control (60.0%) and do not differ from water negative control (30.0%). In what concerns disease severity, significant differences could not be found among the different treatments (Table2).

In the Estremoz trial, in 2014, incidence for artificial infection of ESQUIRE® + *P. chlamydospora* (32.1%) differed significantly from *P. chlamydospora* positive control (67.9%) and did not differ from water negative control (42.9%). For disease severity, water negative control (5.5%) differed significantly from *P. chlamydospora* positive control (15.5%). Both treatments, individually, did not differ significantly from artificial infection of ESQUIRE® + *P. chlamydospora* (7.1%). (Table2).

Table 2 - *Phaeoaniella chlamydospora* (Pch) incidence and severity of for treatments carried out in Alenquer in 2013 and in Estremoz 2014

Treatments	Alenquer 2013		Estremoz 2014	
	Incidence (%)	Severity (%)	Incidence (%)	Severity (%)
water negative control	30.0 a	5.0 a	42.9 ab	5.5 a
artificial infection Pch (positive control)	60.0 b	19.7a	67.9 b	15.5 b
ESQUIRE + artificial infection Pch	23.3 a	4.4 a	32.1 a	7.1 ab

In 2013, *P. chlamydospora* severity was variable in the three different levels of isolation. In *P. chlamydospora* positive control it was higher in level 3 than in levels 1 and 2 and on artificial infection of ESQUIRE® + *P. chlamydospora* was higher in level 3 followed by level 1 and finally level 2. On positive control and water negative control, severity was variable in the three different levels of isolation, being the highest percentage found for level 3, followed by level 2 and level 1 (Figure 1). In 2014, *P. chlamydospora* severity percentages were once more variable in the three different levels of isolation, with the higher percentages being found for level 3 (Figure 2).

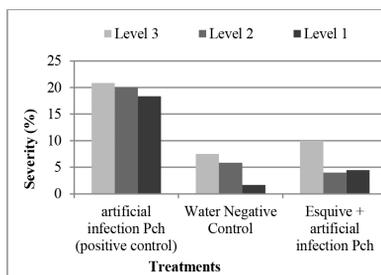


Figure 1 - *Phaeoaniella chlamydospora* severity at level 1, level 2 and level 3 in treatments (2013).

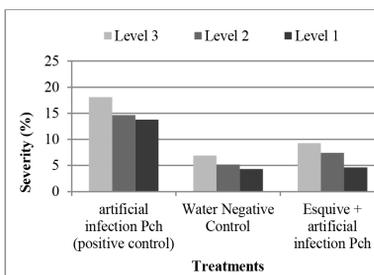


Figure 2 - *Phaeoaniella chlamydospora* severity at level 1, level 2 and level 3 in treatments (2014).

For the 2013 trial in Alenquer, *N. parvum* incidence for artificial infection of ESQUIVE® + *N. parvum* (53.3%) did not differ significantly from water negative control (47.0%) but significant differences from *N. parvum* positive control (90.0%) could be found. Disease severity for artificial infection of ESQUIVE® + *N. parvum* (14.3%) did not differ significantly from water negative control (6.4%) but both were significantly different from the positive control (47.5%) (Table 3).

For the 2014 trial in Estremoz, *N. parvum* incidence in artificial infection of ESQUIVE® + *N. parvum* (32.1%) differed significantly from water negative control (57.1%) and from positive control (89.3%). The lowest value of incidence was obtained for artificial infection of ESQUIVE® + *N. parvum*. For severity, ESQUIVE® + artificial infection of *N. parvum* (6.8%) differed significantly from positive control (64.3%) but did not differ significantly from the water negative control (22.0%) (Table 3).

Table 3 - *Neofusicoccum parvum* (Np.) incidence and severity of for treatments carried out in Alenquer in 2013 and in Estremoz 2014

Treatments	Alenquer 2013		Estremoz 2014	
	Incidence (%)	Severity (%)	Incidence (%)	Severity (%)
water negative control	47.0a	6.4a	57.1c	22.0a
artificial infection Np (positive control)	90.0b	47.5b	89.3b	64.3b
ESQUIVE + artificial infection Np	53.3a	14.3a	32.1a	6.0a

In 2013, *N. parvum* severity was variable in the three different levels of isolation. For all the treatments the higher percentages of severity were found on level 3 (Figure 3). Finally, in 2014, severity was once more variable in the three different levels of isolation, with the higher percentages being found for level 3 (Figure 4).

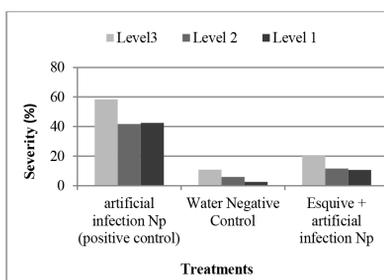


Figure 3 - *Neofusicoccum parvum* severity at level 1, level 2 and level 3 in treatments (2013).

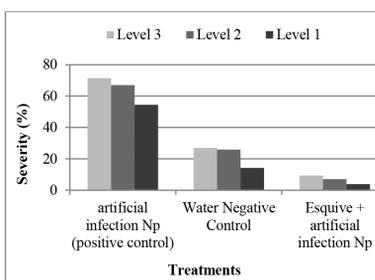


Figure 4 - *Neofusicoccum parvum* severity at level 1, level 2 and level 3 in treatments (2014).

4 - DISCUSSION AND CONCLUSION

The objective of the experiment was to assess the potential of ESQUIRE®, BCA, under different environmental conditions, for the protection of pruning wounds against fungal pathogens, *P. chlamydospora* and *N. parvum*, being the effectiveness of the treatments evaluated through the ability to reduce artificial infections of pruned grapevine canes by these two fungi.

ESQUIRE® showed a good control of incidence on both pathogens, and also a fairly good effect for *P. chlamydospora* severity and a very good effect on *N. parvum* severity. Reisolation percentages of positive controls ranged from 67.9% to 89.3% in *P. chlamydospora* and *N. parvum*, respectively.

For both years and for both vineyards, ESQUIRE® showed the ability to reduce incidence and severity for the two fungi under study. In fact, ESQUIRE® was able to reduce incidence for percentages as high as 36.7% (Table 2) for *P. chlamydospora* and 57.2% for *N. parvum* (Table 3) and severity for 15.3% (Table 2) and 57.5% (Table 3), respectively.

With the exception of *N. parvum*, on 2013, on both years (2013 and 2014) essays ESQUIRE® proved to be able to reduce both incidence and severity even when compared with the water negative control, which can be somewhat of an indicator of the natural infections occurring in the vineyard.

According to MUTAWILA *et al.* (2015), the protection of grapevine pruning wounds is currently the only way to prevent the infection of trunk pathogens since there are no post-infection eradication methods for diseased vines without the loss of production. Since wounds remain susceptible to infection for a longer period, and wound protection does not persist until the wound is no longer susceptible, some researchers have therefore suggested multiple fungicide applications (MUNKVOLD & MAROIS,

1993a). Biological control agents such as *Fusarium lateritium* and *Trichoderma* spp. grow on the wound and provide long-term protection but lack the instant protective effect. MUNKVOLD & MAROIS (1995) also reported in grapevines a strong correlation between temperatures after pruning and the rate of colonisation of pruning wounds by naturally occurring epiphytes which may act as competitors in wound colonization by *Eutypa lata*. The same correlation might be occurring in this study, since the objective of ESQUIRE® is biocontrol through colonization of the pruning wounds. Although it might not have the instant protective effect of the chemical fungicides, conditions that are optimal for the development of GTDs are also the optimal for the efficacy of this biofungicide. This fact can be supported when comparing the results of both years and vineyards. In fact, 2013 appeared to be having been a less favourable year for the development of GTDs as lower values of incidence and severity were found, comparatively to 2014. Also, it was on the 2013 *N. parvum* essay that the only exception of ESQUIRE® not being able to reduce both incidence and severity to values below the ones found for the water negative control occurred. In 2014 where there were apparently better conditions for GTDs, in the vineyard under study, ESQUIRE® was able to significantly reduce the incidence and severity for both pathogens.

Considering the importance of preventing wood pathogens infection through pruning wounds and slowing down colonisation of wood fungi, we strongly consider that ESQUIVE® can be regarded as a potential BCA product for pruning wound protection against *P. chlamydospora* and *N. parvum* associated with the accurate cultural practices for a sustainable control of GTDs.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially supported by AGRAUXINE – LESAFFRE Plant Care.

REFERENCES

- ARMENGOL *et al.* (2001). Fungi associated with esca and grapevine decline in Spain: a three year survey. *Phytopathologia Mediterranea* (40), S325-S329.
- BERTSCH *et al.* (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* (62), 243-265.
- BRUEZ *et al.* (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea* (52), 262-275.
- CALZARANO *et al.* (2009). Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea* (48), 20-31.
- CALZARANO *et al.* (2001). Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano D’Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea* (40), S443-S448.
- CALZARANO *et al.* (2014). Grapevine leaf stripe disease symptoms (esca complex) are reduced by a nutrients and seaweed mixture. *Phytopathologia Mediterranea* (53), 543-558.
- CASTILLO-PANDO *et al.* (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* (30), 59-63.
- CHAPUIS *et al.* (1998). Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology* (47), 463-472.
- CHIARAPPA (2000). Esca (black measles) of grapevine. An overview. *Phytopathologia Mediterranea* (39), 11-15.
- CLOETE (2015). Characterization of the Basidiomycetes associated with esca disease of South African grapevines. *PhD Thesis, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa*, 128pp.
- CRISTINZO (1978). Gravid attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite provinciali di Invernica. *Informatore Fitopatologico* (6), 21-23.
- CROUS *et al.* (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* (55), 235-253.
- EDWARDS & PASCOE (2004). Occurrence of *Phaeoconiella* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* (33), 273-279.
- ELENA *et al.* (2015). Effect of inoculum dose of three grapevine trunk pathogens on the infection of artificially inoculated pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea* (54), 345-354.
- FELICIANO *et al.* (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea* (43), 66-69.

- FISCHER (2006). Biodiversity and geographic distribution of Basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a world perspective. *Phytopathologia Mediterranea* (45), S30-S42.
- GIMENEZ-JAIME *et al.* (2006). Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* (154), 598-602.
- GRANITI *et al.* (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of disease? *Phytopathologia Mediterranea* (39), 16-20.
- GROSMAN & DOUBLET (2012). Maladies du bois de la vigne: synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémiologie actuelle. *Phytoma* (651), 31-53.
- LARIGNON & DUBOS (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* (103), 147-157.
- LARIGNON & DUBOS (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* (39), 184-189.
- LARIGNON *et al.* (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus Biologies* (332), 765-783.
- LARIGNON *et al.* (2001). Observation of black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* (40), S336-S342.
- LARIGNON *et al.* (2015). First report of young grapevine decline caused by *Neofusicoccum parvum* in France. *Plant Disease, first look*.
- MAGNIN-ROBERT *et al.* (2011). Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology* (38), 856-866.
- MOLLER & KASIMATIS (1978). Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Disease* (62), 254-258.
- MUGNAI *et al.* (1999). Esca (Black Measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* (83), 404-417.
- MUNKVOLD & MAROIS (1993b). Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa* dieback. *Phytopathology* (83), 624-629.
- MUNKVOLD & MAROIS (1995). Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *Phytopathology* (85), 249-256.
- MUNKVOLD & MAROIS (1993a). The effects of fungicides on *Eutypa lata* germination, growth and infection of grapevines. *Plant Disease* (77), 50-55.
- MUTAWILA *et al.* (2015). Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl* (60), 387-399.
- PASQUIER *et al.* (2013). Impact of foliar symptoms of "Esca proper" on proteins related to defense and oxidative stress of grape skins during ripening. *Proteomics* (13), 108-118.
- PETZOLDT *et al.* (1981). *Eutypa* dieback of grapevine: seasonal differences in infection and duration of susceptibility of pruning wounds. *Phytopathology* (71), 540-543.
- PHILLIPS *et al.* (2007). *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria obtusa*". *Fungal Diversity* (25), 141-155.
- RAVESTI *et al.* (1987). Un deperimento della vite causato da *Sphaeropsis malorum* in provincia di Reggio Emilia. *Informatore Fitopatologico* (1), 59-61.
- REGO *et al.* (2005). Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. *Abstracts OILB-Meeting Working Group of Integrated Control in Viticulture*. Darfo Boario, Italy.
- SAVOCCHIA *et al.* (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species from declining grapevines in sub tropical of Eastern Australia. *Vitis* (46), 27-32.
- SOSNOWSKI *et al.* (2007). The influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa* dieback in grapevines. *Phytopathology* (97), 1284-1289.

- SPAGNOLO *et al.* (2014a). Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mourvèdre) to the Botryosphaeria dieback agents of *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Science* (15), 9644-9669.
- SPARAPANO *et al.* (2001). Three year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopatologia Mediterranea* (40), S376-S386.
- SURICO *et al.* (2008). *The esca disease complex. In: Integrated Management of Diseases caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria.* (A. Ciancio, & K. G. Mukerji, Edits.) Heidelberg, Germany: Springer.
- ÚRBEZ-TORRES (2011). The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopatologia Mediterranea* (50), S5-S45.
- ÚRBEZ-TORRES *et al.* (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agent of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* (92), 519-529.
- VAN NIEKERK *et al.* (2011). Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopatologia Mediterranea* (50), S139-S150.

A RAZÃO ISOTÓPICA $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ COMO MARCADOR DE TERROIR: AVALIAÇÃO DA SUA ROBUSTEZ A PROCESSOS TECNOLÓGICOS

Cíntia MOREIRA¹; Raúl BRUNO DE SOUSA²; António CURVELO-GARCIA³,
Maria DE PINHO¹; Jorge RICARDO-DA-SILVA²; Sofia CATARINO^{1,2,3}

A avaliação da origem geográfica do vinho com base na sua composição química e isotópica é actualmente um dos maiores desafios no que respeita à autenticidade. Recentemente, no âmbito de um projecto de investigação sobre marcadores de origem geográfica do vinho, os autores demonstraram a aplicabilidade da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, um marcador com ligação ao solo, para rastreabilidade de DO portuguesas. Actualmente a investigação prossegue na avaliação da robustez deste parâmetro a processos tecnológicos vastamente aplicados em Enologia ou de introdução mais recente, nomeadamente a nanofiltração (NF). Neste estudo, foram efectuados ensaios de NF com vinho branco e vinho tinto, tendo-se avaliado os vinhos e as fracções de NF em termos de características físico-químicas gerais, incluindo parâmetros relacionados com composição fenólica, polissacáridos totais, concentração em Sr e razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Nas condições experimentais ensaiadas, não foi observada diferença significativa entre os valores de razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ das correntes de NF alimentação inicial e alimentação final.

Palavras-chave: vinho, autenticidade, origem geográfica, razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, nanofiltração

1 – INTRODUÇÃO

A avaliação da origem geográfica do vinho, e de outros produtos agrícolas de elevado valor, com base na sua composição química é actualmente um dos maiores desafios relativamente à autenticidade. Em particular, a origem geográfica do vinho é bastante importante, designadamente na UE, onde a OCM Vitivinícola e a valorização de vinhos estão profundamente relacionadas com a proveniência geográfica. Em Portugal, nos últimos 10 anos, 47% do vinho produzido foi certificado com a designação oficial de qualidade Denominação de Origem (DO).

¹ CEFEMA – Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa.

² LEAF – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa.

³ Unidade de Investigação em Viticultura e Enologia – INIAV, 2565-191 Dois Portos. Autor para correspondência: sofiacatarino@isa.ulisboa.pt

Recentemente, no âmbito de um projecto de investigação sobre marcadores de origem geográfica do vinho, esta equipa de investigação demonstrou a aplicabilidade da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, um marcador com ligação ao solo, para rastreabilidade de DO portuguesas (MARTINS *et al.*, 2014, CATARINO *et al.*, 2015). É conhecido que a proporção do isótopo radiogénico ^{87}Sr , enriquecido ao longo do tempo por decaimento radioativo do ^{87}Rb , relativamente ao ^{86}Sr , varia de acordo com a composição e idade geológica. A razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ do vinho reflete a razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ da formação geológica/solo, uma vez que a videira não promove o fracionamento isotópico do Sr e a influência de aditivos enológicos é considerada negligenciável (HORN *et al.*, 1993).

Para além da aplicação óbvia no âmbito do controlo da qualidade, esta ferramenta apresenta enorme potencial de aplicação para caracterização do *terroir*, diferenciação e valorização comercial. Contudo para fins de autenticação e eventual integração no banco de dados isotópicos da UE é fundamental testar a robustez deste marcador às práticas enológicas vastamente aplicadas na indústria/práticas mais recentes, entre as quais, a nanofiltração (NF).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Vinhos

Neste estudo foram utilizados um vinho branco proveniente da DO Dão e um vinho tinto originário da DO Palmela. O vinho branco foi obtido por aplicação do processo convencional de vinificação designado por “bica aberta”, a partir da casta Verdelho, sendo o seu ano de colheita 2014. O vinho tinto foi produzido pelo processo convencional de vinificação por maceração, a partir da casta Castelão, igualmente da colheita 2014.

2.2 - Análise sumária dos vinhos e fracções de NF

A análise sumária dos vinhos (teor alcoólico, acidez total, acidez volátil, extracto seco, massa volúmica, pH, sulfuroso livre e total, substâncias reductoras, intensidade e tonalidade da cor) foi efectuada previamente aos ensaios de NF, de acordo com métodos de análise descritos pela OIV (2015). A pesquisa da fermentação maloláctica foi efectuada nos vinhos tintos por cromatografia ascendente em papel, usando como solvente uma mistura de butanol e ácido acético adicionada de azul de bromofenol. O teor em polissacáridos totais nos vinhos foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por SEGARRA *et al.* (1995). O teor em antocianinas totais e o índice de fenóis totais foram determinados de acordo com o método descrito por SOMERS e EVANS (1977).

2.3 - Concentração em Sr total dos vinhos e fracções de NF

A concentração em Sr dos vinhos foi determinada de acordo com o protocolo descrito por CATARINO *et al.* (2006), após diluição 1:10 das amostras com água desio-

nizada. Este parâmetro foi quantificado com recurso ao espectrómetro de massa com plasma acoplado por indução (ICP-MS) *Perkin Elmer SCIEX Elan 9000*, constituído por nebulizador tipo *cross-flow*, câmara de atomização do tipo Scott em Ryton, cones de níquel, bomba peristáltica com quatro canais modelo *Gilson* e autoamostrador *Perkin-Elmer AS-93 Plus* protegido por câmara de fluxo laminar classe 100 (*Max Petek Reinraumtechnik*). O controlo do sistema analítico foi feito pelo *software Elan 6100 Windows NT* (versão 2.4).

2.4 - Preparação das amostras de vinhos e fracções de NF para análise isotópica

A preparação das amostras para determinação da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ por ICP-MS envolveu as seguintes etapas: digestão por microondas de alta pressão (HPMW), separação de Sr e de Rb por cromatografia de permuta iónica e filtração da fracção de eluição com Sr.

Digestão por HPMW

Nesta etapa efectuou-se a mineralização das amostras, de modo a eliminar a influência negativa da matéria orgânica na separação cromatográfica de Sr e de Rb. Foi utilizado o digestor de microondas de alta pressão *Milestone ETHOS Plus Microwave Labstation*, equipado com um rotor monobloco de alta pressão *Milestone HPR- 1000/6m* com seis posições (sistema fechado, pressão máxima de operação de 100 bar) com vasos de Teflon TFM, um dos quais para controlo de temperatura durante a operação. A digestão das amostras foi aplicada com base no procedimento descrito por CATARINO *et al.* (2010), após algumas adaptações. Em cada vaso, colocaram-se 2 mL de vinho, 2 mL de peróxido de hidrogénio (Trace Select 30% (v/v), Fluka) e 4 mL de água ultrapura.

Separação cromatográfica de Sr e de Rb

De modo a evitar a influência de Rb na razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, efectuou-se a separação cromatográfica de Sr e de Rb de acordo com o protocolo descrito por MARTINS *et al.* (2014), em colunas de cromatografia *HIPEX Duran* (12 mm de diâmetro interno e 200 mm de altura de leito) com a resina de permuta catiónica *Dowex 50W-X8/400* (Sigma-Aldrich).

Filtração

Com o objectivo de minimizar a deposição de EDTA no equipamento de ICP-MS, as fracções de eluição com Sr foram acidificadas a 1% com ácido nítrico bidestilado e conservadas a 5 °C durante 24 horas. Posteriormente efectuou-se a filtração destas amostras com um filtro de seringa *Acrodisc PVDF* 0,45 µm com 25 mm de diâmetro.

2.5 - Razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dos vinhos e fracções de NF

Após preparação das amostras, a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ foi determinada com recurso ao equipamento de ICP-MS referido anteriormente, de acordo com o método descrito por MARTINS *et al.* (2014).

2.6 - Nanofiltração

Os ensaios de NF foram efectuados no equipamento comercial Celfa P-28 constituído por um tanque de alimentação, um permutador de calor, uma bomba de circulação, um módulo de membranas planas, um potenciómetro para regulação do caudal de circulação, uma válvula para o escoamento do concentrado, um manómetro e uma válvula para regulação da pressão (figura 1). A área superficial da membrana é de 25, 52 cm².

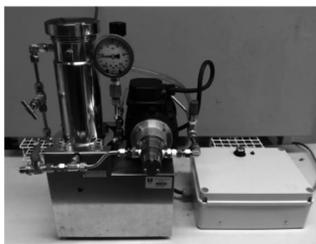


Figura 1 – Instalação de nanofiltração Celfa P-28

2.7 - Preparação e caracterização da membrana de NF

A membrana utilizada foi preparada pelo método de inversão de fases seguido por *annealing*, como descrito por MOREIRA (2015).

De modo a avaliar os parâmetros relacionados com a estrutura da membrana e com as suas características intrínsecas, caracterizou-se a membrana em termos de permeabilidade hidráulica e rejeição a solutos de referência, nomeadamente ao cloreto de sódio (anidro, 99,9%, *VWR Prolabo*), ao sulfato de sódio (anidro, 99%, *Scharlan*), ao sulfato de cálcio (anidro, 99%, *Sigma-Aldrich*) e à glucose (D(+)-Glucose Anidra, *Pan-reac*). Para a determinação da permeabilidade hidráulica, foram efectuados ensaios com caudal de recirculação de 1,4 L/min a 2, 3, 4, 5 e 6 bar. Relativamente à determinação da rejeição a solutos de referência, os ensaios foram efectuados à pressão transmembranar de 6 bar com um caudal de recirculação de 1,4 L/min, sendo a concentração dos solutos na solução de alimentação de 300 ppm. A concentração em sais nas correntes de NF foi determinada com recurso a um condutivímetro *Crison GLP 32* e a concentração em glucose através do equipamento Total Organic Carbon (TOC) *Dohrmann 3300*.

O coeficiente de rejeição foi determinado pela equação 1, onde C_a e C_p são as concentrações de soluto na alimentação e no permeado, respectivamente.

$$f = \frac{Ca - Cp}{Ca} \quad (1)$$

2.8 - Ensaios de NF

Os ensaios de NF foram efectuados com um vinho branco e um vinho tinto, descritos anteriormente. Esta operação ocorreu a 17 bar com um caudal de recirculação de 2,1 L/min. Em cada ensaio, colocaram-se no tanque 500 mL do vinho a permear, tendo-se recolhido amostras de 60 mL de permeado e de alimentação no início e no fim da operação. As fracções de NF dos vinhos foram avaliadas através de caracterização físico-química geral, determinação de polissacáridos totais, características cromáticas, antocianinas totais e índice de fenóis totais, composição mineral e razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

A análise físico-química sumária foi efectuada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e os restantes parâmetros foram determinados pelos métodos descritos anteriormente. Os coeficientes de rejeição foram determinados pela equação 1.

2.9 - Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados relativos à razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dos vinhos e respectivas fracções de NF foram tratados estatisticamente com recurso ao *software Statistica 7* (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok 74104, USA) por aplicação da *One-Way ANOVA* (análise de variância com um factor). As diferenças observadas foram testadas através de uma análise de variância seguida pelo teste de *Fisher Least Significant Difference* (LSD). A significância foi testada a $\alpha=0,05$ ($p<0,05$). De modo a verificar a aplicabilidade dos testes paramétricos, efectuaram-se os testes de homogeneidade de variâncias e de distribuição normal.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Características da membrana de NF

A permeabilidade hidráulica foi determinada a partir da representação gráfica do fluxo de permeado de água desionizada em função da pressão transmembranar. A partir do declive da recta, obteve-se um valor de 0,313 kg/(h.m².bar) para a permeabilidade hidráulica.

A membrana foi também caracterizada a partir da rejeição ao cloreto de sódio (90,3%), sulfato de sódio (95,3%), sulfato de cálcio (92,8%) e glucose (90,3%).

3.2 - Características físico-químicas dos vinhos

As características físico-químicas dos vinhos utilizados nos ensaios de NF encontram-se no quadro 1.

Quadro 1 – Características físico-químicas dos vinhos utilizados nos ensaios de NF (VB – vinho branco; VT – vinho tinto)

Vinho	Dão VB	Palmela VT	Vinho	Dão VB	Palmela VT
Massa volúmica 20°C (g/mL)	0,9889	0,9949	Fermentação maloláctica	---	positiva
Teor alcoólico 20°C (% v/v)	13,0	10,8	Substâncias redutoras (g/L)	1,6	0,2
Extracto seco (g/L)	19,8	28,7	Polissacáridos totais (mg/L)	337	914
Acidez total (g/L) ác. tartárico	5,7	5,1	Intensidade da cor (u.a.)	---	8,990
Acidez volátil (g/L) ác. acético	0,38	0,58	Tonalidade	---	0,680
pH	3,27	3,68	Antocianinas totais (mg/L)	---	252
Sulfuroso livre (mg/L)	40	27	Índice de fenóis totais (u.a.)	7	47
Sulfuroso total (mg/L)	95	40	Absorvância 420 nm (u.a.)	0,069	---

A concentração em Sr total foi avaliada nos dois vinhos, sendo de 239 (6) µg/L para o vinho branco da DO Dão e de 256 (2) µg/L para o vinho tinto da DO Palmela.

As razões isotópicas $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ foram também determinadas, tendo-se obtido o valor de $0,7128 \pm 0,0008$ para o vinho branco da DO Dão e de $0,7075 \pm 0,0007$ para o vinho tinto da DO Palmela. Os valores apresentados correspondem à média de duas réplicas independentes e respectivo desvio-padrão. O vinho da DO Dão apresenta um valor de razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ superior ao do vinho da DO Palmela. Tendo em conta que na DO Dão os solos são maioritariamente de origem granítica (mais antigos), apresentam tipicamente razões isotópicas $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ superiores. Por outro lado, a DO Palmela caracteriza-se por solos argilosos (mais recentes), o que explicará o valor comparativamente mais baixo de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

3.3 - Ensaios de NF

As características físico-químicas das fracções de NF dos vinhos encontram-se no quadro

Quadro 2 – Características físico-químicas gerais das fracções de nanofiltração dos vinhos (A.I. – alimentação inicial; A.F. – alimentação final; P. – permeado; VB – vinho branco; VT – vinho tinto)

	Dão VB			Palmela VT		
	A.I.	A.F.	P.	A.I.	A.F.	P.
Massa volúmica 20°C (g/mL)	0,9897	0,9887	0,9832	0,9951	0,9941	0,9857
Teor alcoólico 20°C (% v/v)	12,6	12,5	11,7	10,6	10,6	9,9
Extracto seco (g/L)	20,7	17,9	1,5	28,6	25,8	2,2
Acidez total (g/L) ác. tartárico	5,6	4,9	0,7	6,1	5,7	1,6
Acidez volátil (g/L) ác. acético	0,29	0,28	0,18	0,76	0,76	0,64
pH	3,22	3,22	3,13	3,52	3,49	3,14

Sulfuroso total (mg/L)	95	89	56	6	19	67
Substâncias redutoras (g/L)	3,2	2,6	0,6	1,7	1,5	0,4
Cinza (g/L)	2,2	1,9	0,4	3,0	2,8	0,5
Ácido tartárico (g/L)	1,5	1,2	nd	1,1	1,1	0,2
Ácido málico (g/L)	1,9	1,6	nd	---	---	---
Ácido láctico(g/L)	0,1	0,2	0,2	2,5	2,3	0,5
Polissacáridos totais (mg/L)	416	583	< 19 ^a	820	1161	< 4,5 ^b
Intensidade da cor (u.a.)	---	---	---	13,375	14,775	---
Tonalidade	---	---	---	0,768	0,738	---
Antocianinas totais (mg/L)	---	---	---	140	170	2
Índice de fenóis totais (u.a.)	6	7	1	46	54	2

nd – não detectado; ^aLQ = 19 mg/L; ^bL.D = 4,5 mg/L

A concentração em Sr nas fracções de NF dos vinhos e os respectivos coeficientes de rejeição encontram-se no quadro 3. A rejeição ao Sr pela membrana de NF é elevada em ambos os vinhos.

Quadro 3 – Concentrações de Sr nas fracções de nanofiltração e respectivos coeficientes de rejeição (f) (A.I. – alimentação inicial; A.F. – alimentação final; P. – permeado; VB – vinho branco; VT – vinho tinto)

Amostra	A.I. (µg/L)	A.F. (µg/L)	P. (µg/L)	f (%)
Dão VB	49 (1)	63,2 (0,6)	0,29 (0,01)	99,4
Palmela VT	58 (2)	89,9 (0,6)	6,61 (0,09)	88,7

Nos ensaios realizados, a razão isotópica ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr da alimentação final não foi significativamente diferente da alimentação inicial, indicando que não houve permeação preferencial de nenhum dos isótopos de Sr (MOREIRA, 2015). De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo, a aplicação da operação de NF no processamento do vinho, não é factor limitativo para a utilização da razão isotópica ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr como marcador de origem geográfica. Estes resultados confirmam a robustez deste marcador na avaliação da autenticidade do vinho. Os resultados foram apresentados com maior detalhe por Moreira (2015).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às empresas Companhia Agrícola do Sanguinhal, José Maria da Fonseca Vinhos e Sogrape Vinhos a colaboração na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CATARINO *et al.* (2006). Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. *Talanta*, 70, 1073–1080.
- CATARINO *et al.* (2010). Grape must mineralization by high pressure microwave digestion for trace element analysis: development of a procedure. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25, 87–93.
- CATARINO *et al.* (2011). Rare earths data for geographical origin assignment of wine: a Portuguese case study. *Bulletin de l'O.I.V.*, 84 (965-967), 223-246.
- CATARINO *et al.* (2014). Multi-elemental analysis throughout soil-wine system as a generator of information on geographic origin. In: Proceedings of 37th World Congress of Vine and Wine, Mendoza, Argentina.
- CATARINO *et al.* (2015). Origem geográfica. In: Química enológica – métodos analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas. 513-538. Curvelo-Garcia A.S. e Barros P. (ed.), Publindústria, Porto.
- HORN *et al.* (1993). $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ from rock and soil and vine and wine. *Z Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung*, 196, 407-409.
- MARTINS *et al.* (2014). $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio in vineyards soils from Portuguese Denominations of Origin and its potential for provenance authenticity. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 48(1), 21-29.
- MOREIRA, 2015. Contributo para o estudo da influência da Nanofiltração na razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ do vinho. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- OIV, 2015. Compendium of international methods of wine and must analysis, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris.
- SEGARRA *et al.* (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 564–570.
- SOMERS e EVANS (1977). Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO_2 , “chemical age”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 279–287.

ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS CATEGÓRICA APLICADA AO PERFIL SENSORIAL DE VINHOS DO PORTO

Alice VILELA ^{(1)*}; Bebiana MONTEIRO ⁽²⁾; Elisete CORREIA ⁽³⁾

RESUMO

Há muitos anos que a análise estatística multivariada é utilizada para tratamentos de dados sensoriais, nomeadamente a Análise em Componentes Principais (PCA). Trabalhos em vinhos, de diferentes categorias e estilos, têm sido publicados, onde esta técnica é aplicada. No entanto, uma vez que as variáveis escolhidas, por análise descritiva quantitativa, são medidas numa escala ordinal e a dimensão da amostra é reduzida a técnica mais adequada é a Análise em Componentes Principais Categórica (CATPCA). Assim, os principais objetivos deste estudo foram: aplicar um método sensorial específico, usada por um painel de provadores treinado, descrevendo os atributos sensoriais mais importantes para os diferentes estilos e marcas de Vinho do Porto e, comparar os resultados da PCA com os resultados da CATPCA, com o intuito de avaliar a viabilidade de ambas as técnicas. No final do trabalho demonstramos que a análise dos dados CATPCA parece ser mais robusta e explica mais de 15% da variação inicial do que a análise PCA.

Palavras-chave: Descritores de vinhos do Porto, perfil sensorial, análise CATPCA, análise PCA.

1. INTRODUÇÃO

No mercado Português, dentro de cada estilo de Vinho do Porto, existem várias marcas. A gestão da marca no mundo empresarial de hoje está extremamente relacionada com a melhoria das estratégias empresariais (MIRALLES *et al.*, 2008). Informação sobre os vinhos e suas características sensoriais é fundamental para o êxito do desenvolvimento e comercialização de cada nova marca de vinho. Este tipo de informação pode ser obtida por meio de testes sensoriais descritivos com painéis de provadores treinados (MEILGAARD *et al.*, 1999; STONE e SIDEL, 2004).

Com o objetivo de detetar diferentes descritores sensoriais em vinhos, e dado que as variáveis são recolhidos recorrendo a uma escala ordinal, uma Análise em Componentes Principais Categórica (CATPCA) pode ser realizada. Como se sabe, nas ciências sensoriais muitas variáveis são nominais ou ordinais e o relacionamento entre as variáveis é frequentemente não-linear, mais ainda, a dimensão da amostra é por vezes

⁽¹⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Biologia e Ambiente - Edifício de Enologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal. * avimoura@utad.pt

⁽²⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁽³⁾ Centro de Matemática da UTAD (CM-UTAD), Departamento de Matemática, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

insuficiente para o uso de técnicas paramétricas. Consequentemente, uma Análise em Componentes Principais (PCA) pode não ser apropriada e deve ser usada somente após verificação das suas condições de aplicabilidade. Mesmo assim, a análise estatística multivariada há muito tem sido utilizada para avaliação das características de um vinho e a PCA tem sido aplicada ao tratamento de dados sensoriais (NOBLE e SHANNON, 1987; ZAMORA e GUIRÃO, 2002; VILANOVA *et al.*, 2009; ESTI *et al.*, 2010; LI-ANG *et al.*, 2013). Nos últimos anos a PCA não-linear foi introduzida e desenvolvida para evitar as limitações da PCA padrão (LINTING *et al.*, 2007).

Os dois objetivos deste estudo foram descrever um método sensorial específico, usado por um painel treinado (MONTEIRO *et al.*, 2014, VILELA *et al.*, 2015), incluindo o desenvolvimento de compostos de referência para estabelecer os atributos sensoriais descritivos mais importantes de diferentes estilos e marcas de Vinho do Porto, comparando os resultados da PCA com os obtidos através da CATPCA com o fim de avaliar a viabilidade de ambas as técnicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinhos

Neste estudo foram avaliadas 28 amostras de Vinho do Porto, de 3 estilos diferentes: 10 Vinhos do Porto Branco; 9 Portos Ruby e 9 Tawny, todos de diferentes empresas da Região Demarcada do Douro (RDD) (Tabela 1).

Tabela 1 - Amostras de vinho avaliadas e respetivos códigos

Estilo de vinho	Marca (B ^b), estilo e n. da garrafa
Porto Branco (W) ^a	BW1 a BW10
Porto Ruby (R)	BR11 a BR19
Porto Tawny (T)	BT20 a BT28

^aW – white, ou branco; ^b – brand

2.2. Seleção de descritores e desenvolvimento de referências

Dois vinhos de cada estilo de Vinho do Porto (Branco, Ruby e Tawny) foram provados por um painel de 12 provadores ao longo de 3 sessões de prova, com duração de 1 hora cada. Foi utilizada a metodologia de livre escolha para atribuição de descritores a cada estilo de vinho (VILELA *et al.*, 2015). A partir de uma longa lista de atributos, uma lista reduzida foi compilado através da análise da frequência de citações. Três sessões de treino foram efetuadas de acordo com a metodologia que seria usada para avaliar os vinhos.

2.3. Análise Sensorial dos vinhos

Todos os vinhos foram avaliados em triplicado em nove sessões de degustação, uma sessão por semana, das 10:00 às 12:00 h. Os vinhos foram distribuídos aleatoriamente ao longo das sessões. As sessões de prova foram realizadas num laboratório de prova, com ambiente controlado: temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e humidade relativa de $60\pm 20\%$. As referências e os vinhos (35 mL por copo) foram servidas em copos de degustação padronizados (ISO, 1977). As garrafas foram abertas imediatamente antes da prova.

As referências e os vinhos foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por MONTEIRO *et al.* (2014). Os atributos foram pontuados utilizando uma escala de 5 pontos (variando de 1-menor intensidade a 5 -maior intensidade) por comparação com a intensidade das referências (VILELA *et al.*, 2015).

2.4. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram efetuadas usando o *Software* SPSS Statistics (v. 20; IBM SPSS, Chicago, IL). A fim de estabelecer os descritores mais importantes para os diferentes estilos de Vinho do Porto e respetivas marcas procedeu-se a uma PCA e a uma CATPCA, ao conjunto dos 28 vinhos e dos 23 atributos escolhidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise em Componentes Principais (PCA)

Com o objetivo de estabelecer e interpretar os descritores sensoriais dos 28 Vinhos do Porto, uma PCA foi aplicada sobre o conjunto total dos 23 atributos selecionados. Para usar a PCA foi necessário verificar alguns pressupostos, ou seja, o Teste de Esfericidade de Bartlett (HAIR *et al.*, 2009) e o teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para verificar a correlação entre as variáveis e a medida de adequação da amostra (HAIR *et al.*, 2009), que deve ser superior a 0,5. Tal como mostra a Tabela 2, no teste de esfericidade de Bartlett um valor estatisticamente significativo ($\text{sig} = 0,00$), indica que existe uma correlação suficiente entre as variáveis. No entanto, um valor baixo de KMO (0,209), indica uma fraca adequabilidade dos dados.

Tabela 2 - KMO e teste de Bartlett (análise PCA)

Kaiser-Meyer-Olkin (Medida de adequação da amostra)	0.209
Aprox. Chi-Quadrado	889.432
Teste de esfericidade de Bartlett, df	253
Sig.	0.000

O modelo bidimensional da PCA, Figura 1, originou um valor próprio de 9,304 para a primeira componente (PC1), indicando que 40,451% de variabilidade total é explicada por essa componente, e um valor próprio de 4,451 para a segunda componente (PC2), indicando que a sua proporção da variância é de 19,874%. Assim, as duas componentes explicam 60,325% da variação total.

O modelo não destacou diferenças entre as diferentes marcas (*Brands*) no entanto, as amostras de vinho estão reunidas no plano de acordo com o estilo de vinho (Porto Branco, Ruby e Tawny).

Como referimos antes, a PCA foi aplicada sobre um conjunto de 23 atributos, mas apenas 19 deles contribuiu para o modelo bidimensional de uma forma significativa (*loadings* > 0,5; VILELA *et al.*, 2015).

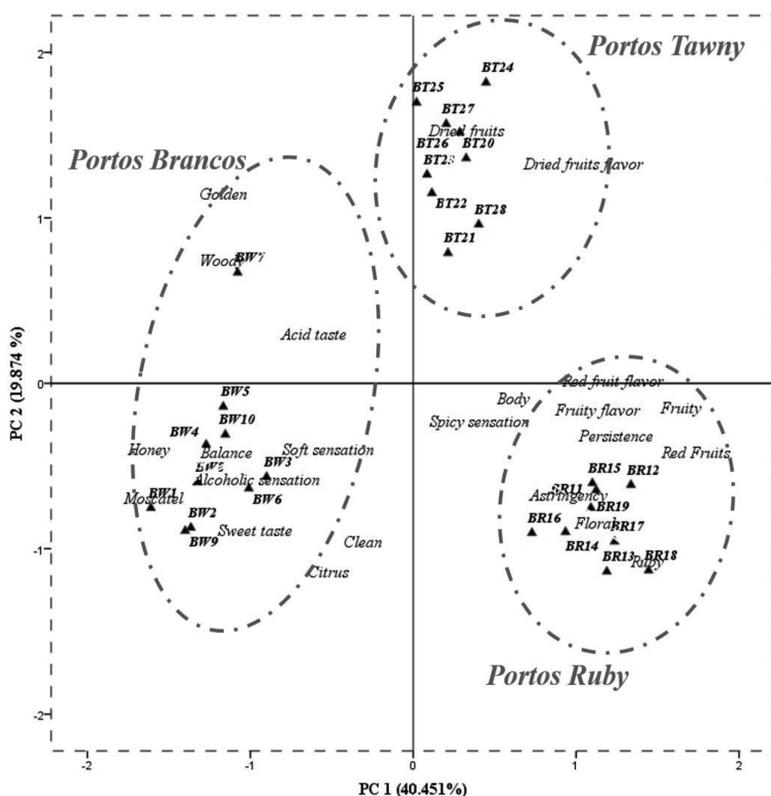


Figura 1 - Projeção dos valores dos atributos sensoriais dos vinhos avaliados, nas componentes 1 e 2, após a PCA.

A primeira componente distingue marcas de Vinho do Porto Ruby, localizadas no eixo positivo, de marcas de Vinho do Porto Branco, no eixo negativo. Nas marcas de Vinho do Porto Ruby, os atributos: *Cor Ruby*, *Persistência*, *Aroma a frutos vermelhos*, *Adstringência* e *Aromas florais* foram dominantes, enquanto nas marcas de Vinho do Porto Branco, atributos como *Aroma a mel*, *Sabor doce*, *Sensação alcoólica*, *Equilibrado* e *Flavor a moscatel* são os que melhor caracterizam estes vinhos. No entanto, o vinho **BW7** (Vinho do Porto Branco, marca número sete) é melhor caracterizado pelos atributos *Cor dourada* e *Aroma a madeira*. Os Vinhos do Porto Tawny são caracterizados pelos atributos nasais (aroma) e orto-nasais (flavor) relacionados com *Frutos secos* (Figura 1).

3.2. Análise em Componentes Principais Categórica (CATPCA)

A Análise em Componentes Principais Categórica (CATPCA) é um método não paramétrico que quantifica as variáveis categóricas por meio de um processo chamado de quantificação ideal (também referido como escalonamento ótimo ou pontuação ótima - MEULMAN *et al.*, 2004). Quando usamos a CATPCA o modelo bidimensional apresentou um coeficiente de consistência interna (Alpha de Cronbach) de 0,954 e produziu um valor próprio de 11,383 para a primeira componente, indicando que 49,492% da variância é contabilizada por esta componente (Tabela 3). Para a segunda componente o coeficiente de consistência interna é 0,862 com um valor próprio de 5,695, indicando que a proporção de variância explicada por esta componente é de 24,761%. Assim, as duas componentes explicam 74,253% da variação total, um valor mais elevado do que o obtido com a PCA.

Tabela 3 – Sumário do modelo CATPCA

Dimensão	Alpha de Cronbach	Variância	
		Total (Valor próprio)	% de Variância
1	0,954	11,383	49,492
2	0,862	5,695	24,761
Total	0,984	17,078	74,253

Para os 28 Vinhos do Porto avaliados obtivemos um projeção (Figura 2) com cada atributo e cada vinho marcados ao longo das dimensões 1 e 2.

A primeira componente distingue as marcas de Vinho do Porto Ruby, localizados no eixo positivo da projeção CATPCA, das marcas de Vinho do Porto Branco, localizadas no eixo negativo. Nas marcas de vinhos do Porto Ruby, os atributos *Cor ruby*, *Aroma a frutos vermelhos*, *Sabor frutado*, *Adstringência* e *Aromas florais* foram

dominantes, enquanto nas marcas de Porto Branco, atributos como *Aroma a mel, Sabor doce, Sensação alcoólica, Equilíbrio, Sabor ácido e Flavour a moscatel* são os que melhor caracterizam estes vinhos. Os Vinhos do Porto Tawny são caracterizados pelo atributo *Flavour a frutos secos*.

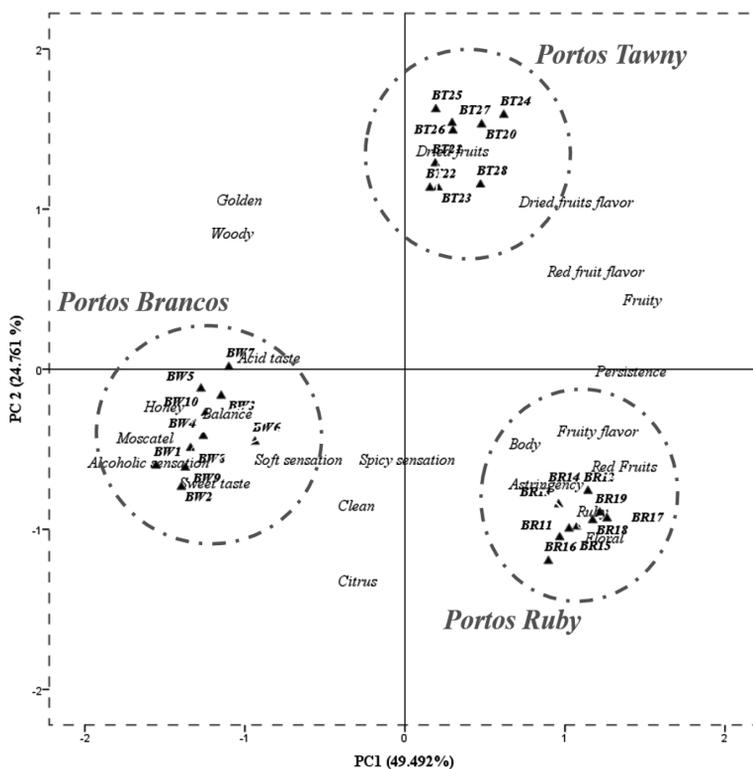


Figura 2 - Projeção dos valores dos atributos sensoriais dos vinhos avaliados, nas componentes 1 e 2, após a CATPCA.

4. CONCLUSÕES

O trabalho apresentado permitiu-nos obter dois resultados que devem ser devidamente ponderados, demonstrando que a aplicação de recursos computacionais deve ser tomada com algum cuidado para não se cometerem erros metodológicos. Em ambas as análises foram consideradas duas componentes, no entanto, a percentagem da variância explicada pela CATPCA inicial é mais elevada (74,253%) do que a explicada pela PCA (60,325%). Claramente, a PCA violou alguns princípios básicos: as variáveis utilizadas foram qualitativas, a medida de adequação da amostra de Kaiser-Meyer-Olkin, que deve ser superior a 0,5 deu um valor de apenas 0,209, indicando que a amostra não era adequada. O tamanho da amostra deve ser grande o suficiente, pelo menos cinco vezes o número de observações em relação ao número de variáveis a serem analisadas, o que não

é o caso no nosso estudo, onde tivemos 23 variáveis e 28 observações. De facto a CATPCA é adequada para uma análise onde há mais variáveis que observações. Além disso, a CATPCA agrupou os vinhos de acordo com o estilo de vinho (Porto Branco, Ruby ou Tawny), independentemente das marcas dos vinhos, ocorrendo uma maior coesão entre os grupos, que parece ser apropriada às amostras de vinho em questão.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao painel de provedores da Empresa Gran Cruz Porto-Sociedade Comercial de Vinhos Lda, que participou, com empenho, neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESTI M.; AIROLA R.L.; MONETA E.; PAPERAI O M.; SINESIO F. (2010). Qualitative data analysis for an exploratory sensory study of grechetto wine. *Analytica Chimica Acta*, 660, 63-67.
- HAIR J.; ANDERSON R.E.; TATHAM R.L.; BLACK W. (2009). *Multivariate Data Analysis*. 687 p. Prentice Hall, New Jersey.
- ISO (1977). ISO 3591 - Sensory analysis. Apparatus wine tasting glass. *International Organization for Standardization*, Geneva.
- LIANG H.-Y.; CHEN J.-Y.; REEVES M.; HAN B.-Z. (2013). Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*, 51, 855-865.
- LINTING M.; MEULMAN J.J.; GROENEN P.J.F.; VAN DER KOOIJ A.J. (2007). Nonlinear principal components analysis: Introduction and application. *Psychological Methods*, 12, 336-358.
- MEILGAARD M.; CIVILLE G.V.; CARR B.T. (1999). *Sensory evaluation techniques*. 416 p. CRC Press, Boca Raton.

- MEULMAN J.J.; VAN DER KOOIJ A.N.; HEISER W. (2004). Principal Component Analysis with Nonlinear Optimal Scaling Transformations for Ordinal and Nominal Data. In: Handbook of quantitative methodology for the social sciences. 49-70. Kaplan Sage, London.
- MIRALLES C.; MORETTO L.; SCHMITT V.G.H. (2008). Gestão de marcas e arranjos produtivos: A marca “Vinho do Porto”. *Comportamento Organizacional e Gestão*, 14, 85-95.
- MONTEIRO B.; VILELA A.; CORREIA E. (2014). Sensory profile of pink port wines: Development of a flavour lexicon. *Flavour and Fragrance Journal*, 29, 50-58.
- NOBLE A.C. e SHANNON M. (1987). Profiling zinfandel wines by sensory and chemical analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1-5.
- STONE H. e SIDEL J.L. (2004). Sensory evaluation practices. 377 p. Elsevier Academic Press, San Diego.
- VILANOVA M.; MASA A.; TARDAGUILA J. (2009). Evaluation of the aromatic variability of Spanish grape by quantitative descriptive analysis. *Euphytica*, 165, 383–389.
- VILELA A.; MONTEIRO B; CORREIA E. (2015). Sensory profile of Port wines: Categorical Principal Component Analysis, an approach for sensory data treatment. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 30(1), 1-8.
- ZAMORA M.C. e GUIRÃO M. (2002). Analyzing the contribution of orally perceived attributes to the flavor of wine. *Food Quality and Preference*, 13, 275–283.

APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER NA DETERMINAÇÃO DE CLORETO E SULFATO DE VINHOS

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de um vinho é obtida através do perfeito equilíbrio entre as suas propriedades analíticas e consequentes características organoléticas. Assim, a constituição das uvas e o processo de vinificação originam uma combinação específica de componentes que determinará o carácter final do vinho [1]. O vinho é principalmente composto por água, etanol e açúcares, no entanto, muitos outros elementos químicos fazem parte da sua constituição [2]. Entre eles encontram-se os aniões cloreto e sulfato (SO_4^{2-}), os quais são também importantes indicadores na avaliação da qualidade de um vinho. Tal como outros parâmetros, a sua concentração deve ser controlada e obedecer aos limites legalmente impostos.

O anião cloreto está naturalmente presente nos vinhos em quantidades reduzidas. No entanto, a sua concentração pode variar de acordo com a origem geográfica e correspondentes condições geológicas e climáticas associadas, aumentando quando estes provêm de vinhas localizadas perto da costa. Elevados níveis de cloreto podem também indicar práticas fraudulentas de filtração, estabilização [3], clarificação e correções organoléticas [4] dos vinhos.

O anião sulfato também faz parte da composição natural do vinho. No entanto, vários fatores influenciam a sua concentração, como a composição química do solo onde cresceram as vinhas, os tratamentos fitoquímicos aos quais foram sujeitas e ainda tratamentos enológicos efetuados durante o processo de vinificação. Elevados níveis de sulfato podem aumentar a adstringência e a turbidez (devida a instabilidade proteica) dos vinhos, mas podem também indicar a adição de certos compostos como sulfato de cobre, sulfato de amónio e ácido sulfúrico. Estas adições, (embora efetuadas com o objetivo de melhorar a qualidade dos vinhos), são em alguns casos consideradas práticas fraudulentas [5, 6].

Prestando garantir a satisfação e a segurança dos consumidores, vários procedimentos analíticos foram desenvolvidos para avaliar a qualidade dos vinhos em todas as etapas da sua produção (incluindo também a determinação dos aniões cloreto e sulfato) [5, 7, 8]. No entanto, ao longo do tempo foi surgindo a necessidade de desenvolver procedimentos mais rápidos, automatizados e eficientes, mantendo simultaneamente um elevado nível de reprodutibilidade, precisão e exatidão. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) surgiu como uma possível solução, ao cumprir todos estes requisitos [9]. Além dos benefícios descritos, esta é uma técnica não destrutiva, que

requer pouca ou nenhuma preparação prévia da amostra, conseqüentemente evitando a formação de resíduos tóxicos [10]. Algumas das limitações frequentemente associadas à espectroscopia de infravermelho são particularmente realçadas quando esta técnica é aplicada em vinhos. A presença de água e etanol, cujas bandas dominam o espectro de absorção na região do infravermelho médio, interferem na determinação de outros compostos importantes. A similaridade química entre os principais componentes do vinho traduz-se em características de absorção similares na região do infravermelho [9, 11]. Para ultrapassar algumas destas limitações é necessário combinar procedimentos de calibração intensivos com ferramentas quimiométricas tais como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*).

Apesar do grande número de estudos já desenvolvidos e publicados e da sua implementação em análises de rotina, o potencial da espectroscopia de infravermelho ainda não foi completamente explorado nesta área. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da capacidade da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier na determinação das concentrações de cloreto e sulfato em vinhos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Conjunto de dados

Foram disponibilizadas pela CVRVV (Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes) 45 amostras (matrizes de vinhos diferentes), que constituíram a base deste projeto experimental. Com o objetivo de representar uma vasta diversidade de vinhos e assim aumentar a robustez do método, as amostras foram selecionadas de forma a incluir diferentes tipos (branco, tinto, rosado, tranquilo, espumante) e variedades de vinhos de colheitas recentes (2012 e 2013) de diversas regiões vitivinícolas portuguesas (Douro, Dão, Vinhos Verdes).

É de salientar que, a baixa concentração e variabilidade dos parâmetros, aumentou a dificuldade do desenvolvimento das calibrações. Conseqüentemente, para a determinação de cloretos e sulfatos, foi necessário expandir a gama inicial de concentrações. Para tal, as 45 matrizes de vinho selecionadas foram divididas em dois conjuntos de 20 e 25 amostras e submetidas a fortificação controlada de cloretos e sulfatos, respetivamente. Para cada matriz de vinho foram selecionados cinco níveis de concentração e estes foram testados de forma a estarem compreendidos entre o limite de quantificação do método de referência e o limite legal permitido. Foram assim obtidos conjuntos de 100 e 125 amostras para os parâmetros cloretos e sulfatos, respetivamente. Estes conjuntos abrangeram variabilidade suficiente para garantir uma construção adequada dos modelos preditivos, incluindo simultaneamente os limites estabelecidos pela regulamentação legal (1 g/L e 2 g/L para cloretos e sulfatos respetivamente [12]).

A preparação de soluções padrão altamente concentradas de cloreto de sódio (Sigma- Aldrich, St. Louis MO, USA) e sulfato de potássio (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), asseguraram uma adição mínima destas soluções às amostras

originais, consequentemente evitando alterações das características das matrizes originais.

As amostras utilizadas foram recolhidas a partir de vinhos comercializados, que excluiriam à partida a necessidade de qualquer tipo de pré-tratamento. No entanto, para excluir a possível presença de partículas e remover o CO₂ existente, todas as amostras foram filtradas e desgaseificadas antes do doseamento.

2.2. Análises de referência

Os resultados analíticos de referência, usados para as calibrações de sulfato e cloreto, foram obtidos através de métodos internos baseados em técnicas de análise em fluxo contínuo e deteção espectrofotométrica com incertezas de 15% e 17% respetivamente. A determinação de sulfato é baseada numa reação colorimétrica, na qual a intensidade corante é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de analito. Depois da adição de uma solução de cloreto de bário, os iões sulfato presentes reagem com o catião bário, formando um precipitado de cloreto de bário. O excesso de bário resultante da reação é dialisado pelo reagente corante. A diminuição de cor é medida por espectrofotómetro UV/Vis a 630nm. A determinação de cloreto é também baseada numa reação colorimétrica. No entanto, neste caso, a amostra é diluída numa solução de tiocianato de mercúrio, que origina a formação de cloreto de mercúrio e a libertação de ião tiocianato. Na presença de ião férrico, o tiocianato forma um complexo vermelho,

cujas intensidade de cor é medida num espectrofotómetro a 490 nm. O número de amostras e medições, bem como alguns detalhes, estão resumidos na Tabela 1.

2.3. Análises por espectroscopia de infravermelho (com transformada de Fourier)

A aquisição de espectros por FTIR foi efetuada em amostras previamente filtradas e desgaseificadas, usando um espectrómetro Multispec IRTF UV/Vis (CETIM, France) e detetor Avatar 370 (Thermo Nicolet Corporation, Madison, Wisconsin, USA) equipado com o software Bacchus Acquisition/Quantification (CETIM, France).

As medições foram realizadas em modo de absorvância entre 3050 e 1000 cm⁻¹, com uma resolução espectral de 16 cm⁻¹, sendo cada espetro o resultado de 22 *scans*.

Os espectros foram obtidos usando uma cuvete de CaF₂ com um percurso ótico de 0.1 mm. As análises foram realizadas a 25°C, recorrendo a um amostrador automático, que usando aproximadamente 10 ml de amostra permitiu determinações em duplicado e pré-lavagem do sistema (controlado por sistema Peltier). Foram efetuadas medições de *background* usando água desionizada, antes de cada sessão de trabalho. De forma a evitar erros por alteração química das amostras, foram assegurados curtos períodos de tempo entre as análises de referência e a aquisição dos espectros por FTIR.

2.4. Processamento dos dados

Os espectros das amostras foram traçados entre os 3050 e os 1000 cm^{-1} (Figura 1). Da sua análise visual resultou a exclusão imediata da região compreendida entre 1700 cm^{-1} e 1570 cm^{-1} devido à saturação do sinal observada nessa área. De facto, outros autores reportaram comportamentos espectrais semelhantes, em regiões muito próximas à anteriormente mencionada, devido às fortes absorções da água e do etanol [1, 13-15].

Os espectros resultantes (compreendidos entre 1570-1000 cm^{-1} e 3050-1700 cm^{-1}) foram posteriormente subdivididos em quatro regiões espectrais, de acordo com a aglomeração dos picos e bandas distribuídos ao longo do comprimento de onda espectral. As quatro regiões resultantes, assim como todas as suas possíveis combinações, foram avaliadas para a construção dos modelos de regressão multivariada. Vários métodos de pré- processamento (normalização SNV (*Standard Normal Variate*), derivadas de primeira e segunda ordem de Savitzky-Golay, correções de dispersão MSC (*Multiplicative Scatter Correction*), EMSC (*Extended Multiplicative Scatter Correction*) e OSC (*Orthogonal Scatter Correction*)) foram testados, tanto individualmente como combinados, no tratamento dos espectros brutos, com o objetivo de remover variações espectrais indesejadas causadas por desvios da linha de base, efeitos de dispersão da luz e variações de temperatura. No entanto, os modelos desenvolvidos funcionavam melhor quando não era aplicado qualquer tipo de pré-processamento espectral.

Para detetar a presença de eventuais anomalias de comportamento espectral, foi efetuada uma análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*). A ausência de agrupamentos de amostras, indicou não existirem efeitos de matriz visíveis, assegurando simultaneamente a diversidade das amostras selecionadas e a inexistência de amostras atípicas que pudessem ser consideradas *outliers* [16].

2.5. Análise multivariada dos dados

Os modelos de calibração foram desenvolvidos para cada um dos parâmetros propostos (cloreto e sulfato), visando a sua determinação quantitativa em vinhos. As equações de calibração foram baseadas na aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), cujo fundamento consiste na correlação entre os dados espectrais e os respetivos valores de concentração obtidos através de métodos analíticos de referência. Neste trabalho foi aplicado o algoritmo PLS-1 [17].

Cada conjunto de amostras foi aleatoriamente dividido em dois subconjuntos: um conjunto de calibração (composto por 70% do grupo de amostras original que lhe deu origem) e um conjunto de teste (composto pelos restantes 30%). Esta divisão, apesar de aleatória, assegurou simultaneamente que todos os tipos de matrizes de vinhos eram incluídos, tanto no conjunto de calibração como no de teste, evitando deste modo um desequilíbrio de matrizes. Do conjunto de calibração fizeram parte 70 e 87 amostras enquanto o grupo de teste incluiu 30 e 38 amostras para os modelos desenvolvidos para

o cloreto e o sulfato, respectivamente. Para cada modelo o número ótimo de variáveis latentes foi selecionado recorrendo ao método de validação cruzada *leave-one-out*, incluindo apenas o conjunto de calibração [18]. A precisão dos modelos foi inicialmente avaliada através do erro de validação cruzada (RMSECV (root mean square error of cross-validation)). A capacidade preditiva dos modelos foi posteriormente testada com as amostras independentes, pertencentes aos conjuntos de teste. Para isso, cada grupo de amostras independentes foi projetado no respetivo modelo desenvolvido, possibilitando

a avaliação de cada modelo relativamente às suas capacidades preditivas através da obtenção dos erros de previsão (RMSEP (root mean square error of prediction)) e do coeficiente de determinação (R^2_p) [14]. Para cada um dos parâmetros modelados, foram ainda calculadas figuras de mérito como o limite de deteção, sensibilidade (SEN) e seletividade (SEL), de acordo com a teoria NAS (net analyte signal) [19, 20]. O parâmetro adimensional RER (range error ratio) [21] e o RPD (residual predictive deviation) [18] foram também estimados e utilizados como ferramenta de avaliação da capacidade preditiva dos modelos PLS.

Todos os cálculos foram efetuados usando como ferramenta o programa Matlab versão 8.3 (MathWorks, Natick, MA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Procedimentos de calibração e estatísticos

Tal como referido previamente, os espectros foram divididos em quatro regiões espectrais: região 1 (1120-1000 cm^{-1}), região 2 (1570-1120 cm^{-1}), região 3 (2800-1700 cm^{-1}) e região 4 (3050-2800 cm^{-1}) (Figura 1).

A otimização dos modelos PLS (no que refere a regiões espectrais e número de variáveis latentes) foi executada considerando exclusivamente o conjunto de amostras de calibração, considerando o erro de validação cruzada (RMSECV) como medida do desempenho do modelo. Este procedimento permitiu a identificação das regiões espectrais e técnicas de pré-processamento mais adequadas e a conseqüente seleção do melhor modelo de regressão para cada parâmetro. Grande parte das regiões espectrais consideradas foram incluídas nos modelos de calibração de cada parâmetro. Além disso, verificou-se ainda que, depois de centrados na média, os modelos apresentavam melhores performances quando as técnicas de pré-processamento não eram aplicadas.

A precisão dos modelos de previsão, avaliada em termos de erros de previsão (RMSEP) e coeficientes de determinação (R^2_p), foi classificada em conformidade com os critérios propostos por Tamaki e Maza [22]. Estes consideram excelentes as previsões cujo R^2_p seja superior a 0.90 e valores de RPD superiores a 3.0. De acordo com estes critérios, o modelo desenvolvido para o sulfato (combinando as regiões 1, 2 e 3, com $R^2_p = 0.98$, RMSEP = 0.11 g/L, RER = 22.3 e RPD = 6.3) pode ser considerado excelente relativamente à sua capacidade preditiva e notavelmente capaz

de determinações quantitativas deste parâmetro em vinhos. Quanto ao parâmetro cloreto, o modelo

desenvolvido combinando as regiões 2, 3 e 4, apresentou os melhores resultados ($R^2_p = 0.83$, $RMSEP = 0.18$ g/L, $RER = 7.9$ e $RPD = 2.4$). Neste caso, a sua capacidade preditiva, torna-o adequado para determinações semi-quantitativas de cloreto em vinhos. Esta pode representar uma solução valiosa sempre que o objetivo seja determinar se o parâmetro está ou não de acordo com os limites estabelecidos legalmente. A correlação entre os modelos de regressão PLS e os respectivos resultados de referência encontram-se representados na Figura 2.

O desempenho da técnica analítica proposta pode ser avaliado através do cálculo das figuras de mérito: seletividade, sensibilidade e limite de detecção (Tabela 2). Neste caso, a seletividade representa a parte do sinal medido para cada amostra que corresponde unicamente ao parâmetro em causa. Para permitir uma interpretação global do seu significado, foi calculado o valor médio em percentagem para cada um dos parâmetros. No caso do anião sulfato, o vetor NAS capturou 13.5 % do sinal espectral original, que foi consequentemente usado no desenvolvimento do modelo de regressão. Para o anião cloreto, apenas 1.9 % do sinal capturado foi usado na construção do modelo. No entanto, é importante notar que os modelos desenvolvidos tanto para o cloreto como para o sulfato incluem uma grande parte da região espectral e simultaneamente um elevado número de variáveis latentes (6 e 9 respetivamente), facto que pode explicar a baixa seletividade da técnica para estes parâmetros. A sensibilidade define a extensão da variação do sinal em função da concentração. Os valores da sensibilidade podem ser comparados quando o mesmo parâmetro ou propriedade estão a ser estimados por diferentes modelos. No entanto, neste caso, estão a ser determinados dois parâmetros diferentes, consequentemente, a comparação das sensibilidades não representa uma interpretação útil. Os limites de detecção obtidos para cada um dos modelos, realça a aptidão do método proposto. Tanto para o cloreto ($LOD = 0.53$ g/L) como para o sulfato ($LOD = 0.33$ g/L) os valores obtidos são inferiores aos correspondentes limites legais estabelecidos para estes compostos em vinhos (1 g/L e 2 g/L respetivamente).

3.2. Interpretação espectral

A presença de iões cloreto em vinhos é frequentemente determinada através da concentração de cloreto de sódio. No entanto, em solução aquosa, este sal está completamente ionizado nas suas formas monoatómicas que não absorvem na região do infravermelho. Consequentemente, a medição espectroscópica do anião cloreto em vinhos apenas pode ser efetuada de forma indireta, medindo a influência que este pode causar na absorção de outros compostos presentes nas matrizes de vinho. Os coeficientes de regressão foram representados graficamente (Figura 3) de forma a facilitar a detecção dos grupos funcionais mais afetados pela presença de cloreto, permitindo assim a sua determinação indireta pela espectroscopia de FTIR. Verificaram-se contribuições significativas nas regiões próximas de 1130 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} , 2340 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} . Esta observação parece

indicar uma influência do anião cloreto nas ligações de hidrogénio, consequentemente afetando a ligação C-O *stretching* dos álcoois, aminas e ácidos carboxílicos observados entre 1570 e 1000 cm^{-1} [23]. O comportamento vibracional do grupo C=O dos ácidos carboxílicos, também parece ter sido afetado pela presença de cloreto, explicando a elevada contribuição observada na região próxima de 1700 cm^{-1} . As ligações O-H *stretching* (da água e etanol) e C-H foram também aparentemente perturbadas pelo anião cloreto, também na região próxima dos 3000 cm^{-1} .

Os iões sulfato existem no vinho como uma ressonância híbrida, respondendo à radiação infravermelha a 1150-1060 cm^{-1} , devido a bandas de absorção S-O e S=O [23, 24]. Assim, ao contrário do cloreto, o ião sulfato pode ser medido diretamente. Representando graficamente os coeficientes de regressão é possível confirmar a elevada contribuição das regiões contendo bandas de absorção S-O e S=O, para a construção do modelo (Figura 3).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram propostos modelos de calibração baseados na regressão por mínimos quadrados parciais para a determinação de cloreto e sulfato em vinhos. O método utilizado, (baseado na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier), produziu um coeficiente de determinação elevado ($R^2_p = 0.98$) e um limite de deteção suficientemente baixo (LOD = 0.33 g/L), capaz de assegurar a aptidão desta técnica na determinação quantitativa da concentração de sulfato em vinhos. Quanto ao parâmetro cloreto, os resultados obtidos são indicadores da capacidade do modelo para assegurar determinações semi-quantitativas deste parâmetro em vinhos. Assim, estas calibrações surgem como soluções rápidas, fáceis e de baixo custo capazes de auxiliar ou potencialmente substituir os métodos de referência tradicionalmente usados.

O poder da combinação da espectroscopia de infravermelho com técnicas quimiométricas para a determinação de parâmetros de controlo de qualidade em vinhos, foi mais uma vez demonstrado neste trabalho. Além da sua capacidade de fornecer informação química quantitativa, a espectroscopia de infravermelho é também uma técnica multi-paramétrica, o que significa que múltiplos compostos podem ser determinados a partir de uma única medição.

REFERÊNCIAS

- [1] C. Pizarro, J.M. Gonzalez-Saiz, I. Esteban-Diez, P. Orio, Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and iterative predictor weighting, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 2061-2072.
- [2] D. Cozzolino, R.G. Damberg, L. Janik, W.U. Cynkar, M. Gishen, Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spec.*, 14 (2006) 279-289.
- [3] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, Chloride pseudotitration in wines by FIA with a Ag₂S/Ag tubular electrode as detector, *J. Food Compos. Anal.*, 2 (1989) 356-363.
- [4] P. Leske, A. Sas, A. Coulter, C. Stockley, T. Lee, The composition of Australian grape juice: chloride, sodium and sulfate ions, *Aust. J. Grape Wine R.*, 3 (1997) 26-30.

- [5] G. Dugo, L. La Pera, T.M. Pellicanó, G. Di Bella, M. D'Imperio, Determination of some inorganic anions and heavy metals in DOC Golden and Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content, *Food Chem.*, 91 (2005) 355-363. [6] G. Tamasi, D. Pagni, C. Carapelli, N.B. Justice, R. Cini, Investigation on possible relationships between the content of sulfate and selected metals in Chianti wines, *J. Food Compos. Anal.*, 23 (2010) 333-339.
- [7] C. Mongay, A. Pastor, C. Olmos, Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 351-357.
- [8] X. Jun, J. Lima, M. Montenegro, Simultaneous determination of inorganic anions and carboxylic acids in wine using isocratic separation on a permanently coated reversed-phase column and UV indirect detection, *Anal. Chim. Acta*, 321 (1996) 263-271.
- [9] C.D. Patz, A. Blicke, R. Ristow, H. Dietrich, Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis, *Anal. Chim. Acta*, 513 (2004) 81-89.
- [10] A. de Villiers, P. Alberts, A.G. Tredoux, H.H. Nieuwoudt, Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review, *Anal. Chim. Acta*, 730 (2012) 2-23.
- [11] R. Bauer, H. Nieuwoudt, F.F. Bauer, J. Kossmann, K.R. Koch, K.H. Esbensen, FTIR spectroscopy for grape and wine analysis, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 1371-1379.
- [12] Diário da República - I Série-B. 2015. Available online at: http://www.iva.min-agricultura.pt/np4/233?newsId=662&fileName=Portaria_334_94.pdf (accessed 14 January 2015).
- [13] S. Frago, L. Acena, J. Guasch, O. Busto, M. Mestres, Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening, *J. Agric. Food. Chem.*, 59 (2011) 2175-2183. [14] B. Ozturk, D. Yucesoy, B. Ozen, Application of Mid-infrared Spectroscopy for the Measurement of Several Quality Parameters of Alcoholic Beverages, Wine and Raki, *Food Anal. Method.*, 5 (2012) 1435-1442.
- [15] U. Regmi, M. Palma, C.G. Barroso, Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques, *Anal. Chim. Acta*, 732 (2012) 137-144.
- [16] T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies, A user friendly guide to multivariate calibration and classification, NIR Publications, Chichester, UK, 2002.
- [17] P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta*, 185 (1986) 1-17.
- [18] K.H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L.P. Houmoller, *Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*, Multivariate Data Analysis, Oslo, Norway, 2002.
- [19] A.C. Olivieri, N.K.M. Faber, J. Ferre, R. Boque, J.H. Kalivas, H. Mark, Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration, *Pure Appl. Chem.*, 78 (2006) 633-661.
- [20] M.C. Sarraguça, J.A. Lopes, The use of net analyte signal (NAS) in near infrared spectroscopy pharmaceutical applications: Interpretability and figures of merit, *Anal. Chim. Acta*, 642 (2009) 179-185.
- [21] R.N. Páscoa, L.M. Magalhães, J.A. Lopes, FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties, *Food Res. Int.*, 51 (2013) 579-586.
- [22] Y. Tamaki, G. Mazza, Rapid Determination of Lignin Content of Straw Using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food. Chem.*, 59 (2011) 504-512.
- [23] J.L.s. Moreira, L. Santos, Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis, *Anal. Chim. Acta*, 513 (2004) 263-268.
- [24] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, Spectrometric identification of organic compounds, *J. Chem. Educ.*, 39 (1962) 546.

Figura 1: Espectros das amostras.

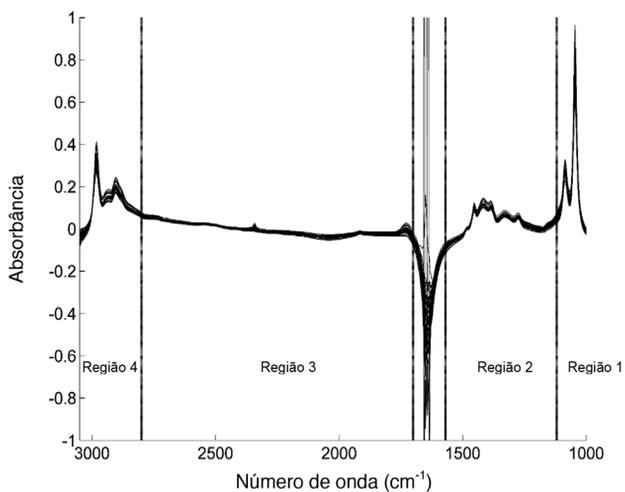


Figura 2: Modelos de regressão PLS para conjunto de calibração (■) versus o conjunto de teste (●) para sulfato e cloreto.

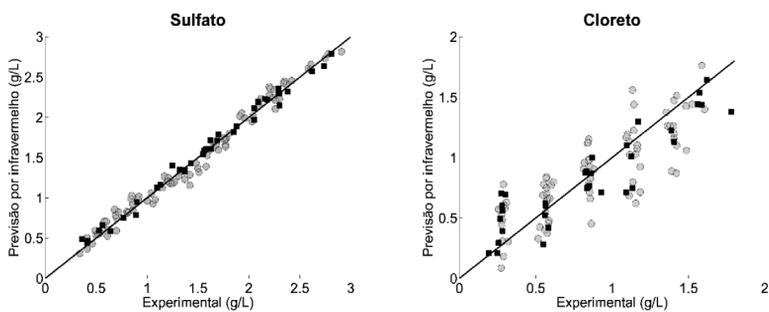


Figura 3: Coeficientes de regressão das calibrações PLS obtidas para os parâmetros cloreto e sulfato em vinhos.

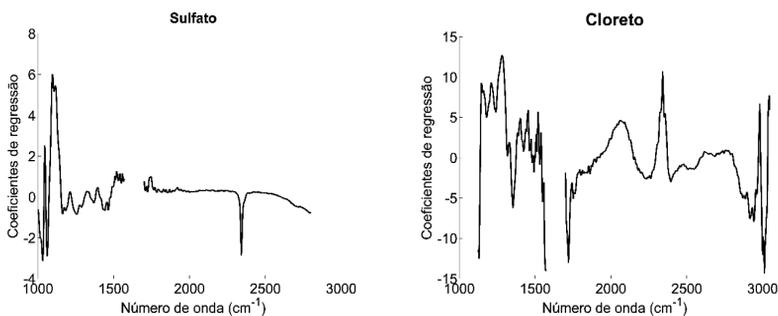


Tabela 1: Sumário das amostras produzidas neste trabalho para o desenvolvimento da metodologia FTIR aplicada à quantificação de cloreto e sulfato em vinhos.

Parâmetro	Metodologia de referência	Amostras	Intervalo	Media	Desvio padrão
Sulfato (g/L)	Análise de fluxo contínuo e detecção espectrofotométrica	125 ^a	0.34-2.91	1.49	0.69
Cloreto (g/L)	Análise de fluxo contínuo e detecção espectrofotométrica	100 ^a	0.194-1.779	0.86	0.43

a) Estas amostras resultam da fortificação de 25 e 20 matrizes originais de vinho, para os parâmetros sulfato e cloreto respectivamente.

Tabela 2: Sumário das propriedades dos modelos de regressão PLS baseados em espectroscopia FTIR, desenvolvidos para a quantificação de sulfato e cloreto em vinhos.

Parâmetro	Modelo		Calibração		Previsão			Figuras de mérito			
	LVs	Região espectral (cm ⁻¹)	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² _p	RPD	RER	Seletividade (%)	Sensibilidade ^a	LOD
Sulfato (g/L)	6	1000-1570, 1700-2800	0.3370	0.3840	0.1096	0.982	6.3	22.3	13.5	0.0350	0.3288
Cloreto (g/L)	9	1120-1570,	0.1858	0.2641	0.1775	0.829	2.4	7.9	1.91	0.0065	0.5325

		1700-3050									
--	--	-----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

LV, variáveis latentes. RMSEC, erro de calibração. RMSECV, erro de validação cruzada. RMSEP, erro de previsão. R²_p, coeficiente de determinação. RPD, desvio residual preditivo. RER, range error ratio. LOD, limite de detecção.

a) Os valores da sensibilidade são expressos como unidades espectrais/unidades de concentração.

APLICAÇÕES DE FTIRATR PARA CONTROLO DE QUALIDADE DE AGUARDENTES

Ofélia ANJOS^(1,2); António J. A. SANTOS⁽²⁾; Leticia M. ESTEVINHO⁽³⁾; Ilda

RESUMO

Neste trabalho pretendese demonstrar a eficácia da aplicação da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier com reflectância total atenuada (FTIRATR) para determinação rápida do teor alcoólico e do teor de vários compostos voláteis, designadamente metanol, acetaldeído e álcoois superiores em aguardentes vínicas e bagaceiras, com e sem envelhecimento.

A medição dos parâmetros referidos por FTIRATR demonstrou ajustarse bem para a quantificação destes compostos, tendo sido encontrados valores de desvio residual de previsão (RPD) a variar entre 12,8 para o teor de metanol (em g/hL P.A.) e 4,1 para o teor de 2+3metil-1butanol (em g/hL P.A.). Os valores do coeficiente de determinação (R^2) variaram entre 99,4 % e 94,1 % respetivamente para os compostos anteriormente referidos.

Neste trabalho são ainda comparados os tempos de resposta e custos de análise comparativamente à técnica de FTIRATR e métodos padrão.

Os resultados mostram que é possível aplicar esta técnica como análise rápida para a determinação do teor alcoólico, do metanol, acetaldeído e álcoois superiores em aguardentes vínicas e bagaceira, com e sem envelhecimento e para alguns parâmetros os modelos apresentam robustez suficiente para serem utilizados nos laboratórios de controlo destes produtos.

Palavras chave: Aguardente; controlo de qualidade, FTIRATR

⁽¹⁾ Instituto Politécnico de Castelo Branco, Apartado 119, 6001909 Castelo Branco. Portugal

⁽²⁾ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349 017 Lisboa. Portugal

⁽³⁾ CIMO – Centro de Investigação de montanha. Departamento de Biologia e biotecnologia. Instituto Politécnico de Bragança/Escola Superior Agrária, Campus Santa Apolónia E 5301 855 Bragança. Portugal.

⁽⁴⁾ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar Laboratório de Enologia Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia, Dois Portos, Quinta da Almoinha, 2565191 Dois Portos. Portugal

⁽⁵⁾ ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002554 Évora. Portugal

1. INTRODUÇÃO

O controlo de qualidade de aguardentes revestese de extrema importância por razões de saúde pública devido à toxicidade de alguns dos seus constituintes. Para além do controlo de qualidade destes produtos, a sua caracterização em termos de composição volátil é muito importante dado que muitos dos compostos voláteis estão muito relacionados com tecnologias de fermentação e destilação e com as características sensoriais.

As técnicas analíticas utilizadas, de acordo com os métodos analíticos de referência são metodologias alternativas, rápidas e com elevada precisão analítica.

A espectroscopia de infravermelho tem sido uma ferramenta analítica amplamente utilizada em várias áreas, devido à rapidez com que as amostras podem ser caracterizadas quase sem manipulação (BLANCO E VILLARROYA, 2002).

A espectroscopia de infravermelho é um método não invasivo que se baseia na análise das vibrações moleculares resultantes da excitação provocada por um feixe de radiação na zona do infravermelho (CORDELLA *et al.* 2002).

A informação analítica dos espectros é analisada e interpretada recorrendo a métodos de quimiometria. A análise espectral é raramente efetuado com os espectros originais, sendo geralmente transformados antes da análise multivariada (BRERETON, 2003).

Em espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) a transmissão e a reflexão total atenuada (ATR) são as técnicas mais utilizadas para a obtenção dos espectros.

O método de FTIRATR provou ser muito robusto em estudos de controlo de qualidade e composição de alimentos (ANJOS *et al.*, 2015; GOUVINHAS *et al.*, 2015) bebidas alcoólicas (ANJOS *et al.* 2016; LACHENMEIER, 2007; PALMA, 2002) e na deteção de adulterações dos mesmos (VERSARI *et al.* 2014).

Com este trabalho pretendese efetuar a divulgação dos resultados publicados por ANJOS *et al.* (2016) onde se demonstra a eficácia da aplicação da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier com reflectância total atenuada (FTIRATR) no controlo de qualidade de aguardentes vnicas e bagaceiras, com e sem envelhecimento, no que se refere à sua composição volátil e teor alcoólico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foi avaliado o teor alcoólico, metanol, acetato de etilo, acetaldeído e álcoois superiores (1propanol, 1butanol, 2butanol, 2metil1propanol e 2+3metil1-butanol) de 140 aguardentes vnicas e bagaceiras com e sem envelhecimento.

A quantificação da componente volátil foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGLAR), de acordo com a NP 3263 (CT83, 1990). Esta metodologia foi descrita e validada para aguardentes vnicas e bagaceiras por LUIS *et al.* (2011).

A determinação do teor alcoólico foi efetuada por destilação e densimetria eletrónica de acordo com o método padrão proposto por OIV (2014).

Os espectros das amostras foram adquiridos com um espectrómetro FTIR Bruker (alfa) com uma resolução de 4 cm^{-1} na região do infravermelho no comprimento de onda de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, utilizando um diamante como dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). Efetuaram-se dois espectros por amostra, com 32 scans. Foi efetuada a calibração cruzada com 50 % das amostras e com os outros 50 % a validação dos modelos, cada grupo foi selecionado aleatoriamente, de modo a garantir uma dispersão adequada e semelhante nos dois grupos amostrais.

No processo de otimização dos modelos, foi utilizado como pré-processamento dos espectros: Correção multiplicativa de dispersão; Correção da linha de base; Normalização pelo mínimo e máximo; Normalização vetorial; Primeira derivada; Primeira derivada + Correção multiplicativa de dispersão; Primeira derivada + Correção da linha de base; Primeira derivada + Normalização vetorial; Segunda derivada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros adquiridos para as diferentes amostras (aguardente vínica e Aguardente bagaceiro com e sem envelhecimento) são muito similares pelo que se optou por não diferenciar os modelos por tipo de aguardente (Figura 1).

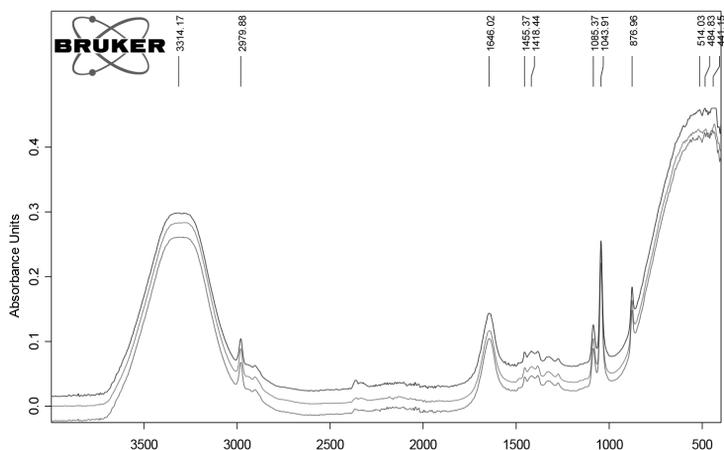


Figura 1 – Espectro médio obtido em FTIRATR para as aguardentes analisadas, pela seguinte ordem: linha superior Aguardente bagaceira, linha intermédia aguardente bagaceira envelhecida e aguardente vínica envelhecida.

Os espectros apresentam picos características dos compostos a analisar:

- 1500 a 900 cm^{-1} \Rightarrow vibrações das ligações C-C e C-O, a 1456 cm^{-1} deformação da ligação C-OH (Lachenmeier, 2007);
- 3314 e 1646 cm^{-1} corresponde OH- alongamento e OH- torção (Shurvell, 2001);
- 1646 cm^{-1} deformação da ligação O-H (Nagarajan *et al.*, 2006).

Na Tabela 1 estão representados os parâmetros estatísticos referentes às amostras analisadas onde se pode observar uma boa distribuição dos dados, necessário para a obtenção de bons modelos de calibração.

Tabela 1 – Parâmetros estatísticos referentes às determinações analíticas para o teor alcoólico, metanol, acetato de etilo, acetaldeído e álcoois superiores (adaptado de ANJOS *et al.*, 2016).

Determinações analíticas	Média \pm desvio padrão	Mínimo-máximo	Coefficiente de variação
Teor Alcoólico (%)	38,7 \pm 2,2	34,3 - 45,8	5,7
Metanol (g/hL A. P.)	468 \pm 417	30 - 2227	89,0
1-Butanol (g/hL A. P.)	2,09 \pm 0,52	1,10 - 3,02	24,8
1-Propanol (g/hL A. P.)	40,4 \pm 12,8	22,5 - 79,4	31,6
2-Butanol (g/hL A. P.)	7,36 \pm 5,31	1,24 - 23,3	72,2
Acetato de etilo (g/hL A. P.)	191 \pm 143	10,9 - 500	74,7
Acetaldeído (g/hL A. P.)	115 \pm 78,2	13,6 - 261	68,3
2-Metil-1-propanol (g/hL A. P.)	67,5 \pm 17,3	34,9 - 100	25,7
2+3-Metil-1-butanol (g/hL A. P.)	217 \pm 44,0	127 - 271	20,0

Os modelos de calibração obtidos para os diferentes parâmetros analisados nas aguardentes (Tabela 2) mostram que os parâmetros estatísticos analisados apresentam robustez suficiente para poderem vir a ser utilizados em laboratório de controle de qualidade.

Os valores do coeficiente de correlação dos modelos variam entre 91,0% e 99,4% e os valores de RPD entre 3,4 e 12,8. O valor mais baixo de RPD é observado para o 2butanol, para o qual não houve número de amostras suficientes para efetuar a validação, tendo-se apenas efetuado a calibração cruzada. Para este parâmetro é necessário efetuar mais ensaios para efetuar toda a metodologia proposta para os outros compostos.

Os valores de RPD para o metanol são superiores aos observados por alguns autores para outros tipos de aguardentes (COLDEA *et al.* 2013; LACHENMEIER, 2007).

Tabela 2 – Modelos de calibração obtidos referentes aos parâmetros analisados (adaptado de ANJOS et al., 2016).

	Região espectral (cm ⁻¹)	Pre-processamento	N	Rk	r ²	RMSECV	RPD
Metanol (g/hL A.P.)	1607-977	MSC	166	7	99,4	32,4	12,8
Teor alcoólico (%)	3057-2864 + 2236-1920 + 1292-663	1stDer	140	2	97,2	0,37	6,0
1-Butanol (g/hL PA)	3998-3638 +1839-758	1stDer+MSC	94	7	96,8	0,092	5,6
2-Butanol (g/hL PA)	3100-2495 +1283-681	1stDer+MSC	52	5	91,0	1,58	3,4
1-Propanol (g/hL PA)	2450-2198+1839-758	1stDer+SLS	94	7	97,4	1,65	6,2
Acetato de etilo (g/hL PA)	2919-2558+1839-1118	SLS	95	7	97,1	24,3	5,9
Acetaldeído (g/hL PA)	3998-3638+1839-758	MSC	95	8	98,2	10,4	7,5
2-Methyl-1-propanol (g/hL PA)	3998-3638 +2919-758	MSC	99	8	95,7	3,56	4,9
2+3-Methyl-1-butanol (g/hL PA)	3998-3638 +2919-758	2ndDer	83	9	94,1	10,7	4,1

MSC - Correção multiplicativa de dispersão; 1stDer – Primeira derivada; 1stDer+MSC - Primeira derivada + Correção multiplicativa de dispersão; 1stDer+SLS - Primeira derivada + Correção da linha de base; SLS - Correção da linha de base; 2ndDer – Segunda derivada; N – número de amostras; Rk – número de componentes principais; r² – coeficiente de determinação; RMSECV - erro quadrático médio da validação cruzada; RPD - desvio residual de previsão.

Em relação às vantagens desta metodologia temos a referir o ganho de tempo. Segundo o método clássico são necessários cerca de 3 dias de trabalho para efetuar as referidas análises enquanto no método utilizando os modelos de calibração em FTIRATR serão necessários apenas 15 minutos contando com os tempos de preparação dos equipamentos para análise. É de referir ainda que no método clássico, os equipamentos afetos às determinações são mais dispendiosos que o espectrómetro FTIRATR.

Quanto aos consumos de reagentes, para os métodos clássico necessitamos dos padrões para GC e de vários reagentes nomeadamente etanol e metanol. A manipulação destes reagentes requer muito cuidado devido aos níveis de toxicidade de alguns deles e geram resíduos ambientalmente problemáticos e que necessitam de tratamento apropriado. No caso das medições em FTIRATR esses problemas não se colocam pelo facto de não ser necessário qualquer reagente para análise ou preparação de amostra.

4. CONCLUSÕES

A metodologia apresentada para avaliação do teor alcoólico e concentração de metanol,

acetaldeído e álcoois superiores em aguardentes víquicas e bagaceiras com e sem envelhecimento é válida e robusta.

Os valores do desvio residual de previsão (RPD) estão compreendidos entre 3,4 e 12,8 garantindo que a maioria dos modelos pode ser usada em laboratórios de controle de qualidade.

Para o 2 butanol, e dado que muitas das amostras analisadas apresentavam concentração inferior ao limite de quantificação, serão necessários mais ensaios para conseguir modelos mais robustos.

Esta técnica tem a grande vantagem de não necessitar de reagentes poluentes e de o tempo de análises ser extramente inferior ao necessário com os métodos clássicos.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, O., CAMPOS, M. G., RUIZ, P. C., & ANTUNES, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, 218–223. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.138
- ANJOS, O., SANTOS, A.J.A., ESTEVINHO, M.L., CALDEIRA, I. (2016). FTIRATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. *Food Chemistry*, in press.
- BLANCO, M. & VILLAROYA, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 240250.
- BRERETON, R. G. (2003). *Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant*, Wiley & Sons. Chichester.
- COLDEA, T. E., SOCACIU, C., FETEA, F., RANGA, F., POP, R. M., & FLOREA, M. (2013). Rapid Quantitative Analysis of Ethanol and Prediction of Methanol Content in Traditional Fruit Brandies from Romania, using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 143–149.
- CORDELLA, C., MOUSSA, I., MARTEL, A.C., SBIRRAZZUOLI, N., & LIZZANI, GOUVINHAS, I., DE ALMEIDA, J. M. M. M., CARVALHO, T., MACHADO, N., & LACHENMEIER, D. W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101(2), 825–832.
- LUÍS, A., MOTA, D., ANJOS, O., CALDEIRA, I. (2011). Single laboratory validation of determination of acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and fusel alcohols in wine spirits, brandies and grape marc spirits using GC/FID. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 26(2), 69–76.
- NAGARAJAN, R., GUPTA, A., MEHROTRA, R., & BAJAJ, M. M. (2006). Quantitative analysis of alcohol, sugar, and tartaric Acid in alcoholic beverages using attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, 2006, 45102.
- OIV (2014). *Compendium of International Methods of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin*. OIV, Paris.
- PALMA, M. (2002). Application of FTIR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta*, 58(2), 265–271. doi:10.1016/S00399140(02)002448
- SHURVELL, H. F. (2001). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Ed.). New York, NY, USA.
- VERSARI A., LAURIE V. F., RICCI A., LAGHI L., PARPINELLO G. P., 2014. Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60:218.

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE VINHOS PRODUZIDOS A PARTIR DAS CASTAS BRANCAS GOUVEIO E VERDELHO

Ana GASPAR^{1,2}, Ilda CALDEIRA^{3,4}, José SILVESTRE³, Rui FLORES², Sandra ALVES²

Resumo

O Verdelho e Gouveio são castas brancas utilizadas em Portugal e noutros países para a produção de vinhos. Tradicionalmente, a variedade Verdelho é usada nos vinhos generosos da região da Madeira e a variedade Gouveio é usada nos vinhos brancos da região do Douro e também em várias regiões de Espanha. Nos

últimos anos, estas duas castas têm sido usadas para a produção de vinhos brancos noutras regiões portuguesas e erradamente, têm sido muitas vezes tratadas como sendo sinónimos uma da outra. Por outro lado a casta Verdelho também sido erradamente considerada como sinónimo da casta italiana Verdicchio e da Verdejo de Espanha.

Assim, este trabalho pretendeu avaliar comparativamente a composição físico-química geral e volátil de vinhos obtidos a partir de uvas Verdelho e Gouveio.

O perfil de compostos voláteis dos vinhos das duas variedades foi bastante semelhante, porém com diferenças significativas nos teores de alguns compostos, tais como isobutanol, acetato de hexilo, lactato de etilo, trans3hexenol, 2,3butanodiol, decanoato de etilo, ácido isovalérico, succinato de dietilo, monosuccinato de etilo e acetato de 2feniletilo.

Cinco meses após o final da fermentação a análise sensorial dos vinhos engarrafados revelaram que os vinhos Gouveio apresentaram notas florais e frutados, com dominância de notas cítricas e de frutos tropicais e que os vinhos Verdelho apresentaram notas frutadas e de mel.

Palavras chave: vinho, Verdelho, Gouveio, análise físico-química, análise sensorial

1. INTRODUÇÃO

O Verdelho e Gouveio são castas brancas utilizadas em Portugal e noutros países para a produção de vinhos. Tradicionalmente, a variedade Verdelho é usada nos vinhos generosos da região da Madeira e a variedade Gouveio é usada nos vinhos brancos da região do Douro e também em várias regiões de Espanha. Nos últimos anos,

¹ Escola Superior Agrária de Coimbra; Bencanta, 3045601 Coimbra, Portugal

² Esporão S.A., Herdade do Esporão, 7200 Reguengos de Monsaraz, Portugal

³ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAVDois Portos, Quinta da Almoinha, 2565191 Dois Portos, Portugal.

⁴ ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002554 Évora, Portugal

estas duas castas têm sido usadas para a produção de vinhos brancos noutras regiões portuguesas e erradamente, têm sido muitas vezes tratadas como sendo sinónimos uma da outra. Por outro lado a casta Verdelho também sido erradamente considerada como sinónimo da casta italiana Verdicchio e da Verdejo de Espanha.

Existe alguma informação sobre a composição dos vinhos brancos Gouveio (RAMOS *et al.* 1999; GONZALEZALVAREZ *et al.* 2011) e também sobre vinhos licorosos de Verdelho (CÂMARA *et al.*, 2004), mas é escassa a informação sobre a composição de vinhos brancos de Verdelho.

A casta Gouveio é de origem desconhecida e está espalhada por todo o país estando mais expandida pelas regiões do Douro, de TrásosMontes e do Dão.

A casta Verdelho é originária das ilhas Atlânticas e erradamente encontrase com o nome de Gouveio no Douro e é confundido com o Verdejo em Espanha. Nas regiões Australianas de Hunter Valley, Langhorne Creek e Swan Valley é muito apreciada. É uma casta pouco sensível ao míldio e medianamente suscetível ao oídio.

Assim, este trabalho pretendeu avaliar comparativamente a composição físicoquímica geral e volátil de vinhos obtidos a partir de uvas Verdelho e Gouveio, que foram colhidas e produzidas em escala industrial na mesma exploração vitícola, no sul de Portugal. Foram amostradas as uvas durante a maturação e tendose realizado as análises físicoquímicas dos mostos. Após a fermentação, os vinhos foram amostrados e submetidos à análise sensorial, tendose avaliado também a composição volátil dos vinhos por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada a um detector de ionização de chama e apor espectrometria de massa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Campo de ensaio e maturação

O ensaio estava instalado numa vinha na Herdade do Esporão, localizada na subregião de Reguengos de Monsaraz. O estudo decorreu em duas parcelas, parcela T5DGouveio e T6C1Verdelho. As principais características destas parcelas encontramse descritas em GASPARG (2012). Para a evolução da maturação realizaramse colheitas de bagos, com início à maturação tendo sido realizadas no total oito colheitas. Cada amostra era constituída por 250 bagos por casta, colhidas aleatoriamente sobre cachos com diferentes posições, localizados a diferentes alturas e exposições para que a amostra fosse o mais representativa possível. Nas amostras recolhidas realizaramse as seguintes determinações no mosto: grau álcool provável, pH, acidez total.

2.2 Fermentação

Após entrada das uvas na adega, procedeu-se ao desengace, esmagamento e prensagem. Os mostos foram para cubas de decantação durante 48h, sendo depois trasfegados para cubas de fermentação. Durante a fermentação controlou-se o grau Baumé e a temperatura duas vezes por dia (início da manhã e meio da tarde).

2.3 Determinações analíticas efetuadas

2.3.1. Mostos

Teor alcoólico provável determinado por refratometria; pH potenciometria e acidez total titulação potenciométrica.

2.3.2 Vinhos

2.3.2.1 Extração dos compostos voláteis livres

Realizou-se uma extração líquido com diclorometano das amostras de vinho (50mL), conforme metodologia descrita em BOTELHO (2008), seguida da concentração do extrato até um volume de cerca de 0,25mL. As extrações foram realizadas em duplicado tendo-se obtido 8 extratos de vinho. Os extratos foram mantidos a 20°C até à análise por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada a um detetor de ionização de chama (CGLARDIC) e até à análise por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada ao espectrómetro de massas (CGLAREM).

2.3.2.2. Quantificação e análise dos compostos voláteis por CGLARDIC

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGLAR), realizando-se a injeção manual de cada extrato em triplicado.

Utilizou-se um cromatógrafo Agilent Technologies 6890N, equipado com um detetor de ionização de chama (DIC) (260 °C), injetor (260 °C) a funcionar em modo de divisão e com uma coluna capilar de sílica de polietileno glicol (INNOWAX, J&W Scientific, Agilent Technologies, USA 30 m x 0,32 mm x 0,25_μm). O gás de arraste foi o hidrogénio (2,0 cm³.min⁻¹) e a razão de divisão foi de 1:3. O volume de amostra injetado foi aproximadamente de 0,8 a 1,0_μl.

O programa de gradiente térmico foi o seguinte: 40°C (10min), 2,5°C/min até 130° (1 minuto), 4°C/min até 210°C (25 minutos).

A quantificação foi realizada pelo método do padrão interno, sendo os resultados expressos em 2octanol (padrão interno).

2.3.2.4. Identificação dos compostos por CGLAREM

A identificação dos compostos foi realizada num equipamento CGLAREM (Finnigan Mat Magnum). O sistema CGLAREM estava equipado com uma coluna capilar de sílica de polietilenoglicol (DBWAX da J&W: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Condições de análise: injetor e linha de transferência a 250°C; gás de arraste hélio (12psi de pressão interna e razão de divisão de 1:60), volume de injeção 0,20,4_μl.

O espectrómetro de massas trabalhou em modo de impacto de electrões a 70 eV, avaliando uma gama m/z de 40-340 amu. A identificação foi realizada por comparação do espectro de massa com os das bibliotecas de espectros (NIST e WILEY) e sempre que possível confirmado com a análise de substâncias padrão.

O programa de temperatura utilizado foi semelhante ao apresentado anteriormente para o CGLARDIC.

2.3.2.5 Análise sensorial

As duas amostras de vinhos foram avaliadas pelo grupo de prova (8 provadores) de vinhos do INIAVDois Portos, na sala de prova da instituição. As amostras (~30ml) foram apresentadas, em prova cega, em copos padronizados para a prova de vinhos. Foi pedido a cada provador que realizasse a descrição livre da cor, aspeto, aroma e sabor do vinho. Foi igualmente pedida uma apreciação global da qualidade numa escala de 1 a 20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na mesma data, à colheita, as uvas Verdelho apresentaram maior acidez e teor de açúcar mais elevados do que as uvas Gouveio. A fermentação, realizada em escala industrial em tanques de aço de 10000L, foi mais lenta no mosto de Verdelho (GASPAR, 2012).

3.1. Análise sensorial

Relativamente aos resultados obtidos com os vinhos apresentase no Quadro 1 o resumo da descrição sensorial dos vinhos, relativamente à cor, aspecto e sabor.

Relativamente ao aroma foram compilados os descritores, de acordo com a roda de aromas desenvolvida por NOBLE *et al.* (1987) e traduzida por DUARTE e BELCHIOR (1987). Os descritores foram gerados livremente pelo grupo de prova, com o objectivo de ver quais os mais frequentes para cada casta (Fig. 1).

Estes resultados, que constituem uma primeira indicação, evidenciam que os vinhos apresentavam um perfil bastante distinto. O vinho Gouveio apresentou domínio de notas frutadas e florais, mas o carácter frutado mais associado aos citrinos e frutos tropicais, enquanto o vinho Verdelho apresentou notas frutadas, mas um frutado mais doce e com a presença de notas de mel.

Também num estudo de 5 vinhos monovarietais de Gouveio, realizado na Galiza, encontraram como descritores mais frequentes o frutado e floral, com notas cítricas e de maçã (GONZALEZ ALVAREZ *et al.* 2011).

Quadro 1. Resumo da análise sensorial dos vinhos da casta Gouveio e da casta Verdelho

	Vinho da casta Gouveio	Vinho da casta Verdelho
Cor	Citrino	Palha
Aspecto	Límpido/Brilhante	Límpido/Brilhante
Sabor	Vinho fresco, com acidez, equilibrado, com aroma de boca a frutado, citrico e com boa estrutura de boca	Vinho menos fresco, com ligeira acidez, com corpo, equilibrado e persistente.
Apreciação geral	15 valores	13 valores

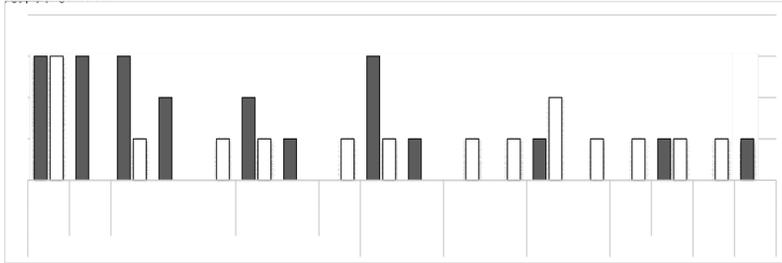


Figura 1. Descritores de aroma e respectiva frequência absoluta obtidos da análise sensorial dos vinhos (Vinho Gouveio em cinzento; Vinho Verdelho em branco).

3.2. Compostos voláteis dos vinhos

Analisouse conforme se descreveu nos materiais e métodos os compostos voláteis dos vinhos.

Procedeu-se numa fase inicial à observação do perfil de compostos presentes nas duas amostras (Fig. 2). A observação dos cromatogramas mostrou-nos que, contrariamente ao que aconteceu na análise sensorial, o perfil de compostos voláteis dos dois vinhos se apresentava muito semelhante, sugerindo que as diferenças verificadas na análise sensorial estejam associadas a outros compostos que não estes que foram analisados ou que a diferença seja devida a diferenças nos teores dos compostos analisados.

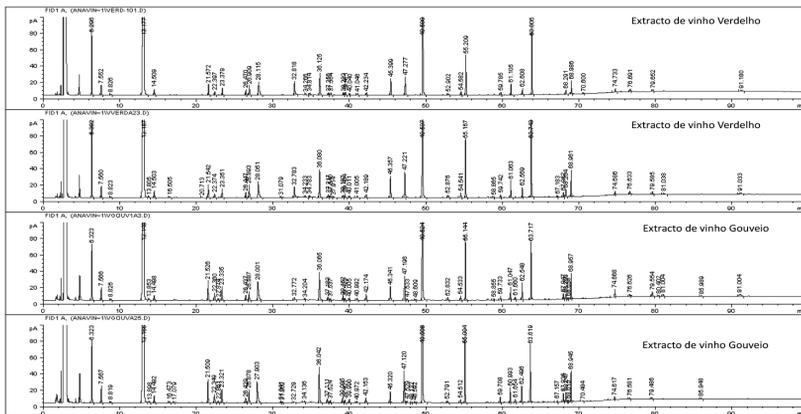


Figura 2. Cromatogramas de extractos de vinhos da casta Verdelho e da casta Gouveio.

Os resultados, relativos à identificação dos compostos nos vinhos analisados, bem como respeitantes à sua quantificação e análise de variância são apresentados no Quadro 2. Apresentase complementarmente os aromas associados a estes compostos, bem como os respetivos limiares de deteção olfativa, com base na bibliografia consultada.

Os compostos voláteis identificados correspondem fundamentalmente a compostos resultantes do metabolismo microbiano. Foi pesquisada a presença de outros compostos designadamente compostos terpénicos e outros, associados habitualmente às uvas, mas não foram detetados nos vinhos em comparação.

No que respeita à comparação dos dois vinhos verificaramse diferenças significativas no teor de alguns compostos, sendo que alguns deles apresentam teores mais elevados nos vinhos da casta Gouveio (lactato de etilo, *trans*-3-hexenol, ácido isovalérico, acetato de hexilo) e outros apresentam teores mais elevados nos vinhos da casta Verdelho (isobutanol, 2,3butanodiol, decanoato de etilo, succinato de dietilo, acetato de 2-feniletilo e monosuccinato de etilo).

Considerando os descritores associados aos compostos, poderse á admitir que o carácter frutado e adocicado atribuído aos vinhos da casta Verdelho será devido ao elevado teor em ésteres que estes vinhos apresentam. No entanto, é difícil perceber o explicar as notas florais associadas aos vinhos da casta Gouveio.

Para esclarecer quais os compostos com mais importância para o aroma serão necessários outro tipo de estudos designadamente de olfatométria (GCO) os quais permitem a análise olfativa do efluente de cromatografia.

Quadro 2. Resumo da quantificação dos compostos identificados nos vinhos da casta Gouveio e Verdelho.

Composto	Aroma associado e limiares	Teores médios nos vinhos (expressos em mg de 2-octanol/l)		Resultado da análise de variância
		Verdelho	Gouveio	
Butanoato de etilo	Papaia, manteiga, adocicado, maçã (0.35mg/l) ^a	0,315	0,318	ns
1-Propanol	Álcool (750mg/l) ^a	2,175	3,354	ns
Isobutanol	Álcool (200mg/l) ^a	8,247	5,836	**
Acetato de isoamilo	Banana, frutado; maçã (0.16; 1.0mg/l) ^{a,c}	1,403	1,775	ns
2+3-Metil-1-butanol	Álcool, solvente, banana(60-65mg/L) ^a	147,569	135,452	ns
Hexanoato de etilo	Maçã, frutado, adocicado (0.3mg/l) ^a	1,004	0,857	ns
Acetato de hexilo	Adocicado, aromático, perfumado (2.4mg/l) ^a	0,000	0,157	***
Lactato de etilo	Morango, framboesa, perfumado ^a (150mg/l)	1,701	2,820	***
1-Hexanol	Hortelã, herbáceo (4mg/L)	0,538	1,188	ns
<i>trans</i> -3-Hexenol	Herbáceo ^c	1,204	2,041	**
Octanoato de etilo	Maçã, adocicado, frutado ^a (0.58mg/l)	1,513	1,347	ns
3-Hidroxi-butanoato de etilo	Frutado ^c ; químico ^e (1.2mg/L) ^f	nq	nq	-
2,3-Butanodiol	Manteiga, natas ^b (600 mg/l) ^a	1,604	0,604	**
γ -Butirolactona	Caramelo, doce ^c (0.035mg) ^g	4,545	5,193	ns
Ácido butanóico	Manteiga, queijo ^c (2.2mg/l) ^a	0,495	0,546	ns
Decanoato de etilo	Ácidos gordos, frutado, maçã ^a (0.51mg/l)	0,414	0,275	**
Ácido isovalérico	Chulé, queijo ^c (0.7mg/l) ^a	0,477	0,592	**
Sucinato de dietilo	floral, batata doce; cânfora ^c	0,475	0,305	**
3-Metil-tio-1-propanol	Couve 1,2mg/l ^b	0,278	0,375	ns
Monoacetato de 1,3 propanodiol	-	0,449	0,863	***
Acetato de 2-feniletilo	Rosas, mel, maçã, adocicado (30mg/L) ^a	2,797	2,240	*
Ácido hexanóico	Suor ^d (8mg/l) ^j	3,835	4,254	ns
2-Feniletanol	Rosas, adocicado, perfumado (100mg/l) ^a	23,227	27,897	ns
Malato de dietilo	Pêssego, relva cortada ^c ; adocicado, algodão, queimado ^a (760mg/l) ^b	0,491	0,569	ns
Ácido octanóico	Suor, queijo ^k (10mg/l) ^j	6,364	8,085	ns
Ácido decanóico	Gordura, ranço ^k (6mg/l) ^j	1,594	1,530	ns
Monosuccinato de etilo	Caramelo, café (1000mg/l) ^g	11,346	7,483	**

δ média dos 4 extratos analisados (2 amostras de cada vinho x 2 extratos de cada vinho); nq- não quantificável; ns-não significativo; nível de significância de 5% -, de 1%-** ou de 0.1%-***. a-RIBEIRO-CORREIA 1996 b-BOTELHO 2008 c-CALDEIRA 2004, d-PINEAU^U et al. 2009, e-FALCO 2004, f-HONGKU et al 2011 g- MALHERBE 2011,h-TAO E LI 2009 i-<http://www.flavornet.org/> kovacs.html; j -ETIEVANT 1991, k-SÁNCHEZ-PALOMO et al., 2010, l-SÁNCHEZ-PALOMO et al 2012.

Assim, nesta primeira abordagem os resultados sugerem que os vinhos têm um perfil semelhante no que respeita aos compostos voláteis da fração livre. As diferenças entre os vinhos das duas castas (Verdelho e Gouveio) resultam fundamentalmente de diferenças no teor dos compostos. Estudos posteriores serão necessários para validar e confirmar estes primeiros resultados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Otilia Cerveira do INIAV o apoio dado às análises dos compostos voláteis dos vinhos e aos provedores, também do INIAV, a disponibilidade e empenhamento demonstrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOTELHO G. 2008 Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonese and Trincadeira Vitis vinifera L. cultivars. PhD Dissertation. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real.
- CALDEIRA I., 2004. O aroma de aguardentes víquicas envelhecidas em madeira. Importância da tecnologia de tanoaria. 233 p. Tese de Doutoramento em Engenharia AgroIndustrial, Universidade Técnica de Lisboa.
- CÂMARA J.S., HERBERT P., MARQUES J.C., ALVES M.A 2004 Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* 513: 203–207
- DUARTE F.L., BELCHIOR A.P. 1987 Terminologia dos aromas do vinho adaptado de Noble et al. 1987.3p. EVNINIA.
- ETIEVAN P. X. 1991. Wine. In *Volatile Compounds in Food and Beverages*, H.Maarse (ed.). Marcel Dekker: New York.
- FALCO V. 2004. Caracterização do aroma de vinhos da Vitis vinifera L. var. Touriga Nacional. 179 p. Tese de Doutoramento, Universidade de TrásosMontes e Alto Douro, Vila Real. Portugal.
- GASPAR A. C. 2012 Caracterização morfológica e do mosto das castas Verdelho e Gouveio. Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Alimentar . Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra. GONZÁLEZÁLVAREZ M., GONZÁLEZBARREIRO C., CANCHOGRANDE B., SIMALGÁNDARA J. 2011. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC–MS. *Food Chemistry* 129: 890–898.
- HONGKU, K., LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN O. 2011 Durian Flavor Extracts and its Volatile Characteristics *Agricultural Sci. J.* 42: 241244.
- MALHERBE S. 2011 Investigation of the impact of commercial malolactic fermentation starter cultures on red wine aroma compounds, sensory properties and consumer preference PhD Dissertation Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences
- NOBLE A. C., ARNOLD R. A., BUECHSENSTEIN J., LEACH E. J., SCHMIDT J. O., STERN, P. M. 1987. Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 143–146.
- PINEAU B., BARBE JC., VAN LEEUWEN C. DUBOURDIEU D. 2009 Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific 2 “Red” and “Blackberry” Aromas in Red Wines *J. Agric. Food Chem.*, 57 ,3702–3708.
- RAMOS R., ANDRADE P. B., SEABRA R. M., PEREIRA C., FERREIRA M. A., FAIA M. A 1999. A preliminary study of noncoloured phenolics in wines of varietal white grapes (codega, gouveio and malvasia fina): effects of grape variety, grape maturation and technology of winemaking. *Food Chem.* 67: 3944

- RIBEIRO-CORRÊA P. D. L., 1996. Influência de tecnologias de acabamento no aroma de vinhos brancos. Mestrado em Viticultura e Enologia, Universidade Técnica de Lisboa e Universidade do Porto, Lisboa. Portugal.
- SÁNCHEZ-PALOMO E., GARCÍACARPINTERO E. G., GÓMEZ GALLEGOM. A., GONZÁLEZ VIÑAS M. A. 2012 The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region – Determination of Key Odorants in Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications Bekir Salih Ömür Çelikbiçak (Eds) InTech.
- SÁNCHEZ-PALOMO E., GARCÍACARPINTERO E. G., ALONSOVILLEGAS R. GONZÁLEZ-VIÑAS M. A. 2010 Characterization of aroma compounds of Verdejo white wines from the La Mancha region by odour activity values *Flavour Fragr. J* 25, 456–462
- TAO Y.S, LI H. 2009 Active volatiles of cabemet sauvignon wine from Changli *County Natural Science* .1: 176-182.

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DE VINHOS DE TALHA DO ALENTEJO USANDO ICP-MS.

Luís SIMÃO¹; Pedro BARRULAS²; Cristina BARROCAS DIAS³; Maria João CABRITA⁴

RESUMO:

Os Vinhos de Talha do Alentejo representam uma herança da presença romana na península ibérica e a sua compreensão e análise são muito importantes para a sua preservação.

O trabalho que aqui se apresenta, representa uma parte de um estudo alargado sobre vinhos de talha que procura compreender a influência do método de vinificação em talha na composição química destes vinhos, de modo a poder caracterizá-los num contexto mais abrangente de preservação de um património cultural.

Com este trabalho procurou-se saber se as características únicas destes vinhos, conferem alguma alteração na sua composição mineral e se os valores encontrados estão dentro dos valores de referência, nomeadamente no que diz respeito a questões de segurança alimentar, com particular atenção para alguns metais pesados como o Manganês, Níquel, Cobre, Zinco, Cádmio e Chumbo. Para tal, usámos 16 vinhos tintos, 16 vinhos brancos e 15 vinhos palhetes que foram gentilmente cedidos pela organização do concurso VITIFRADES do ano de 2014, e estudou-se a sua composição química elementar em 32 elementos (Na, Mg, Al, P, K, Ca, Sc, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Sr, Cd, In, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Er, Tm, Yb, Pb e Bi) através de ICP-MS.

Os resultados da análise multielementar permitiram concluir que os valores encontrados para estes vinhos estão dentro dos limites esperados, não se verificando nenhuma contaminação metálica, especialmente no que diz respeito a alguns elementos que podem levantar questões importantes de segurança alimentar devido à sua toxicidade.

Palavras-Chave: vinhos de talha, composição elementar, ICP-MS.

¹ Aluno do Mestrado de Viticultura e Enologia da Universidade de Évora.

² IIFA, Laboratório HERCULES, Universidade de Évora, Largo Marquês do Marialva, 8, 7000-809 Évora, Portugal

³ Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química, Laboratório HERCULES, Universidade de Évora, Largo Marquês do Marialva, 8, 7000-809 Évora, Portugal

⁴ Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Fitotécnica, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal; mjbc@uevora.pt

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho visa avaliar a influência do processo tecnológico da elaboração dos vinhos de talha na composição mineral dos mesmos. A utilização de materiais hoje menos usados na adega moderna, como é o caso do barro, contribui para um perfil organolético diferenciador destes vinhos. Importa também saber se o processo de vinificação em talha altera a composição elementar dos vinhos e se os mesmos cumprem requisitos de segurança alimentar. Atualmente, algumas adegas alentejanas recuperaram esta tradição e comercializam vinho de talha engarrafado.

Os elementos minerais que se encontram no vinho têm origem, na sua grande maioria, na absorção radicular da planta, no entanto, ao longo do desenvolvimento da mesma, verifica-se um aumento constante dos elementos durante a formação e maturação do bago (Catarino 2006). O uso de diferentes materiais na adega, como o aço inox, latão, barro, madeira e plásticos, lixiviam elementos que podem contaminar o vinho, como é o caso de Al, Cr, Cd, Co, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, V e Zn (Almeida e Vasconcelos 2003; Castiñeira et al., 2004). Além disso, o próprio processo tecnológico contempla etapas que podem influenciar a composição mineral do vinho, como é o caso do envelhecimento em barricas de carvalho, que aumenta os níveis de Al, Fe, e V, enquanto que níveis de Cr e Ni permanecem inalterados desde a trasfega até ao engarrafamento, indicando desta forma contaminação pelo depósito de fermentação (Almeida e Vasconcelos, 2003). O processo de clarificação com bentonites foi identificado como uma fonte de contaminação do vinho de grande importância, visto que aqui são introduzidas substâncias que podem libertar Al, Cd, Hf, terras raras, Pb e Zr (Nicolini et al., 2001, 2004; Jakubowski, *et al.*, 1999). Também os diferentes métodos de filtração, principalmente os filtros de terra e de celulose contribuem ativamente para o aumento dos níveis de terras raras, bem como Co, Cr, Fe, e Ni. Durante o envelhecimento e engarrafamento, vários estudos provaram a alteração da composição mineral do vinho por contacto com os materiais, como o aumento de Sn em garrafas *screw cap*, (Hopfer, 2013), aumento de Cr em garrafas de vidro colorido com óxidos de Cr (Tariba, 2011) e altos níveis de lantanídeos (terras raras) em vinho armazenado em garrafas de vidro (Rossano *et al.*, 2007).

No caso dos vinhos de talha, importa saber se o contacto com o barro influencia a composição química elementar em metais pesados nos respetivos vinhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Os vinhos

Para a realização deste estudo importava ter uma amostra representativa dos vinhos de talha alentejanos. Vila de Frades, freguesia de Vidigueira, é a capital do vinho de talha e todos os anos é feito um concurso onde são postos à prova estes vinhos. Assim sendo para representar os vinhos de talha seleccionámos os melhores vinhos presentes no concurso da 17ª edição das Festas Báticas - VITIFRADES 2014, que decorreu entre 5 e 7 de dezembro, entre os quais 16 vinhos tintos, 16 vinhos brancos e 15

vinhos palhetes. Foram recolhidos 50 mL de amostra, diretamente das garrafas de vidro para tubos de polipropileno de 50 mL, sendo posteriormente armazenadas entre 3-4°C até ao momento da sua análise.

A estes vinhos foram efectuadas análises físico-químicas de rotina, nomeadamente a determinação do seu teor alcoólico adquirido (% vol) por ebuliometria, pH por potenciometria, acidez total (g/dm³ expresso em ácido tartárico) e acidez volátil (g/dm³ expresso em ácido acético) através de titulações potenciométricas.

2.2 Preparação da amostra

Colocadas a temperatura ambiente cerca de 30 minutos antes da sua preparação, as amostras de vinho foram sujeitas a três diluições diferentes de forma a determinar na mesma análise elementos maioritários, minoritários e traço de interesse. Cada amostra foi diluída 10x, 100x e 1000x com água ultra pura (18.2 M_.cm@25°C, MilliQ® Integral 3) contendo 2% (v/v) de ácido nítrico (qualidade Suprapur, Merck).

Foram preparadas soluções de brancos das análises e padrões (ICP-MS-68-A e ICP-MS-68-B da High-Purity Standards®) para construção de uma curva de calibração com uma solução de etanol (12-14%) e ácido tartárico (pH 3.2-3.3), acidificadas com 2% de ácido nítrico, de forma a garantir uma matriz semelhante à das amostras em estudo.

2.3 Equipamentos e condições operacionais

Para a caracterização elementar dos vinhos em estudo, utilizou-se um Agilent 8800 ICP- MS Triplo Quadrupolo (QQQ). Antes da quantificação multielementar por ICP-MS, o equipamento foi calibrado e foi verificada a sua sensibilidade, formação de óxidos ($CeO^+/Ce^+ < 1.2\%$) e formação de catiões duplamente carregados ($Ce^{2+}/Ce^+ < 2\%$), através da aspiração de uma solução facultada pela Agilent Technologies.

Foram preparadas soluções de padrões para construção da curva de calibração nas concentrações de 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 3000 ppb's, respetivamente. Todas as curvas de calibração para os elementos maioritários apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,999.

O limite de deteção (LOD) foi determinado através da análise de 11 replicados de uma solução de branco e de 11 replicados de uma solução padrão multielementar de 200 ppb's, calculado através da seguinte fórmula:

$$LOD = \frac{3\sigma \times Conc.(ppb)}{(CPS200ppb - CPSbranco)}$$

O limite de quantificação (LOQ) determinou-se assumindo 10 vezes o valor do respetivo LOD.

Os limites de deteção e de quantificação para os elementos maioritários apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Limites de detecção e de quantificação para os elementos maioritários.

	²³ Na	²⁴ Mg	³¹ P	³⁹ K	⁴⁴ Ca
LOD(ppb)	0,110	0,061	1,025	3,113	4,137
LOQ(ppb)	1,104	0,612	10,246	31,133	41,369

Durante toda a análise, a amostra foi misturada com uma solução de padrão interno (400 ppb's de Ir) para controlo e correção de possíveis *drifts* nos resultados. As condições operacionais do ICP-MS encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições operacionais utilizadas na análise das amostras de vinhos por ICP-MS.

Acquisition Mode	Spectrum
Spectrum Mode Option	Q2 Peak Pattern: 1 Point Replicates: 3 Sweeps/Replicate: 10
Scan Type	MS/MS
Plasma Parameters	
RF Power	1550 W
RF Matching	1.7 V
Sample Depth	10 mm
Carrier Gas (Ar)	1.01 L/min
Plasma Gas (Ar)	15 L/min
Nebulizer Pump	0.10 rps
Collision Cell	
Collision Gas: He	Flow: 4.5 mL/min
Analysis Mode	No gas and He mode
Dwell time	
0.1s	⁹ Be, ²⁷ Al, ⁴³ Ca, ⁴⁴ Ca, ⁴⁵ Sc, ⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶¹ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁸ Sr, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁵ In, ¹⁹³ Ir
0.3s	¹³³ Cs, ¹³⁷ Ba, ¹³⁹ La, ¹⁴⁰ Ce, ¹⁴¹ Pr, ¹⁴⁶ Nd, ¹⁴⁷ Sm, ¹⁵³ Eu, ¹⁵⁷ Gd, ¹⁶⁶ Er, ¹⁶⁹ Tm, ¹⁷² Yb, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 encontram-se os valores obtidos para o teor alcoólico, acidez total, acidez volátil e pH dos vinhos em estudo.

Tabela 3 – Análise sumária dos vinhos em análise. (média ± desvio padrão, máximo e mínimo)

Vinho	Teor Álcool (% vol)	Acidez Total (g/dm ³ Ác. Tart.)	Acidez Volátil (g/dm ³ Ác.Acét.)	pH
Branco	13,3 ± 1,1	5,51 ± 0,52	0,52 ± 0,15	3,64 ± 0,13
	(11,0-14,9)	(4,46-6,30)	(0,30-1,02)	(3,45-3,90)
Palhete	12,1 ± 1,0	5,40 ± 0,73	0,73 ± 0,21	3,43 ± 0,14
	(10,5-14,9)	(4,68-7,33)	(0,48-1,20)	(3,40-3,89)
Tinto	14,2 ± 1,1	5,71 ± 0,72	0,70 ± 0,18	3,78 ± 0,18
	(12,3-15,8)	(4,74-6,90)	(0,51-1,14)	(3,42-4,13)

Através da análise nos resultados, verificamos que os vinhos tintos apresentam, em geral, os teores mais elevados de todos os parâmetros, excepto a acidez volátil que apresenta valores mais elevados nos vinhos palhetes, havendo mesmo dois vinhos com o valor de 1,2 g/dm³, igual ao valor máximo admitido por lei.

Na Tabelas 4 apresentam-se os valores médios dos elementos maioritários para os três conjuntos de vinhos.

Tabela 4 –Elementos maioritários por tipo de vinho (valores médios ± desvio padrão)

Elementos (mg/L)	Vinhos tintos	Vinhos brancos	Vinhos palhetes
²³ Na	22,79 ± 9,97	22,66 ± 11,90	33,53 ± 19,26
²⁴ Mg	142,39 ± 23,96	111,85 ± 11,82	125,33 ± 18,61
³¹ P	281,56 ± 49,46	250,39 ± 46,16	276,39 ± 34,80
³⁹ K	1188,03 ± 362,47	1149,06 ± 238,94	1072,15 ± 152,32
⁴⁴ Ca	68,88 ± 47,63	73,29 ± 19,83	113,49 ± 39,43

Na Tabela 5 apresentam-se os teores médios dos elementos traço e minoritários nos três grupos de vinhos em estudo.

Tabela 5 –Elementos traço e minoritário por tipo de vinho (valores médios \pm desvio padrão) e valores de referência (Catarino 2006).

Elementos ($\mu\text{g/L}$)	Vinhos tintos	Vinhos brancos	Vinhos palhetes	Val. Ref.
²⁷ Al	421,35 \pm 194,32	447,44 \pm 370,65	397,86 \pm 134,27	180 - 8600
⁴⁵ Sc	6,62 \pm 1,64	9,04 \pm 0,98	11,84 \pm 4,69	0,091 - 64,8
⁵¹ V	1,05 \pm 0,62	1,18 \pm 0,55	4,88 \pm 7,89	1 - 447
⁵⁵ Mn	1374,51 \pm 437,98	1686,19 \pm 805,07	2170,29 \pm 940,26	150 - 7836
⁵⁶ Fe	3998,61 \pm 1208,65	3825,53 \pm 2669,17	3273,31 \pm 1257,46	240 - 19400
⁵⁹ Co	2,63 \pm 2,33	1,76 \pm 1,96	2,39 \pm 1,95	1 - 20
⁶⁰ Ni	23,04 \pm 12,66	19,99 \pm 7,51	41,72 \pm 54,94	1 - 510
⁶³ Cu	40,64 \pm 28,29	43,57 \pm 85,24	33,22 \pm 33,17	Lim.Max.1000
⁶⁶ Zn	1160,48 \pm 1523,54	793,23 \pm 266,85	847,27 \pm 318,86	Lim.Max.5000
⁷⁷ Se	10,51 \pm 40,69	nd	nd	0,29 - 26
⁸⁸ Sr	635,35 \pm 243,41	610,42 \pm 296,55	790,23 \pm 199,28	
¹¹¹ Cd	0,45 \pm 0,34	0,19 \pm 0,10	0,26 \pm 0,20	Lim. Max. 10
¹¹⁵ In	0,06 \pm 0,20	nd	nd	
¹³³ Cs	20,58 \pm 24,06	15,77 \pm 13,21	16,59 \pm 10,15	0,04 - 24
¹³⁷ Ba	398,06 \pm 213,20	307,38 \pm 189,75	416,59 \pm 187,72	
¹³⁹ La	0,19 \pm 0,10	0,05 \pm 0,03	0,17 \pm 0,29	
¹⁴⁰ Ce	0,27 \pm 0,14	0,09 \pm 0,05	0,26 \pm 0,36	
¹⁴¹ Pr	0,18 \pm 0,12	0,03 \pm 0,02	0,17 \pm 0,40	
¹⁴⁶ Nd	0,16 \pm 0,09	0,04 \pm 0,03	0,15 \pm 0,30	
¹⁴⁷ Sm	0,17 \pm 0,11	0,03 \pm 0,03	0,16 \pm 0,39	
¹⁵³ Eu	0,15 \pm 0,09	0,04 \pm 0,03	0,15 \pm 0,30	
¹⁵⁷ Gd	0,14 \pm 0,09	0,03 \pm 0,02	0,14 \pm 0,32	

¹⁶⁶ Er	0,14±0,10	0,03±0,02	0,13±0,29	
¹⁶⁹ Tm	0,14±0,09	0,019±0,021	0,129±0,310	
¹⁷² Yb	0,14±0,09	0,030±0,023	0,139±0,304	
²⁰⁸ Pb	12,03±8,18	13,75±18,39	105,01±246,67	Lim. Max.150
²⁰⁹ Bi	0,46±0,77	0,09±0,23	1,09±2,66	0,04 – 2,8

nd – não detetado

Segundo Pohl (2007), os elementos minerais maioritários presentes nos vinhos são o Ca, K, Na e Mg que se encontram em concentrações entre 10 e 1000 mg/L, encontrando-se depois uma série de elementos minoritários como o Al, Fe, Cu, Mn, Sr,

e Zn em concentrações entre 0,1 e 10 mg/L. Os elementos vestigiais, que incluem entre outros, Ba, Cd, Co, Ni, Pb, e V encontram-se em concentrações inferiores a 1 mg/L. Os teores encontrados para os diversos elementos estudados estão de acordo com teores encontrados na literatura para vinhos franceses, italianos e espanhóis, utilizando a mesma metodologia de análise (Grindlay et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste ensaio mostram que os vinhos de talha apresentam um perfil mineral em consonância com os restantes vinhos. A sua segurança alimentar está portanto salvaguardada. Mesmo no que diz respeito a metais pesados, apenas três vinhos palhetes tinham valores acima dos 150 µg/L, facto que pode estar associado a potenciais fontes contaminantes nestes três produtores e desta forma, não estar relacionado com questões do processo tecnológico dos vinhos de talha, como provam os restantes resultados de Pb.

Importa agora dar continuidade a este estudo de forma a analisar as talhas e estabelecer *fingerprints* que permitam provar a autenticidade destes vinhos, de modo a dar ao consumidor uma garantia de que está a provar um produto diferenciado e que este representa parte da herança romana na região.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida C. M., Vasconcelos M. T. (2003) Multielement composition of wines and their precursors including provenance soils and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4788-4798.
- Castiñeira Gómez, M. D. M., Brandt, R., Jakubowski, N., & Andersson, J. T. (2004) Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma- mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2953–2961.
- Catarino S.C.G., (2006) Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Grindlay G., Mora J., deLoos-Vollebregt M.T.C., Vanhaecke F. (2014) Evaluation of the multi-element capabilities of collision/reaction cell inductively coupled plasma– mass spectrometry in wine analysis. *Talanta*, 128: 379–385
- Hopfer, H., Nelson, J., Mitchell, A. E., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2013). Profiling the trace metal composition of wine as a function of storage temperature and packaging type. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28, 1288–1291.
- Jakubowski N., Brandt R., Stuewer D., Eschnauer H.R., Görtges S., (1999) Analysis of wines by ICP-MS: is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 264: 424-428.
- Nicolini G., Larcher R., Mattivi F., (2001) ICP-OES and ICP-MS measurement of mineral elements in grapes and wines: analytical, compositional and enological aspects. Actas do VIII Viticulture and Enology Latin-American Congress, Montevideo, Uruguai.
- Nicolini G., Larcher R., Pangrazzi P., Bontempo L., (2004) Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*, 43: 41-45.
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine? *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 26, 941–949.
- Rossano E. C., Szilágyi Z., Malorni A., & Pocsfalvi G. (2007). Influence of wine-making practices on the concentration of rare earth elements in white wines studied by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:311–317.
- Tariba B. (2011) Metals in wine—impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144: 143–156.

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ALTERNATIVOS DE MADEIRA DE ACÁCIA E DE CEREJEIRA COM POTENCIAL UTILIZAÇÃO ENOLÓGICA

Virginia LOZANO¹; Ana C. CORREIA²; António M. JORDÃO^{2*}; Maria L. GONZÁLEZ SAN JOSÉ¹

RESUMO

Novas tendências têm ocorrido na utilização de diferentes tipos de madeiras na elaboração e conservação dos vinhos, nomeadamente através da utilização potencial de madeiras de outras origens botânicas, que não de carvalho, para utilização enológica, como seja a madeira de cerejeira e de acácia. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante de diferentes extratos de madeira de cerejeira e de acácia. Em paralelo efetuouse uma análise comparativa com os resultados também obtidos em extratos de madeira de carvalho. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: teores em taninos elágicos e outros compostos fenólicos individuais por HPLC, atividade antioxidante e ainda a avaliação do potencial redox. Os resultados obtidos permitiram constatar a existência de um menor número de compostos fenólicos nos extratos de madeira de cerejeira assim como uma menor atividade antioxidante comparativamente às restantes madeiras. Por outro lado, verificouse ainda a presença de compostos fenólicos específicos só quantificados nas madeiras de cerejeira e de acácia.

Palavras chave: atividade antioxidante, alternativos de madeira, composição fenólica, acácia, cerejeira.

¹ Universidade de Burgos, Faculdade de Ciências, Departamento de Biotecnologia e Ciência dos Alimentos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Espanha.

² Instituto Politécnico de Viseu (CI&DETS), Escola Superior Agrária, Estrada de Nelas, Quinta da Alagoa, Ranhados, 3500606 Viseu, Portugal. *Email: antoniojordao@esav.ipv.pt

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fragmentos de madeira como forma alternativa à utilização de barricas iniciou-se nos anos 60 do século XX nos Estados Unidos, tendo o seu uso rapidamente generalizado a outros países. Em 2005, a OIV aprovou o uso de aparas de madeira (Resolução Oeno 3/2005) como produtos alternativos à utilização de barricas, encontrando-se no entanto, esta autorização restringida às madeiras de carvalho e de castanheiro. Assim, atualmente existe uma grande diversidade de produtos alternativos de madeira de carvalho que são apresentados sob várias formas, dimensões, níveis de tosta e de diferentes origens botânicas e geográficas (CABRITA *et al.* 2011; JORDÃO *et al.* 2012).

Nos últimos anos, com o forte incremento da utilização da madeira de carvalho e com os potenciais problemas inerentes à gestão e conservação dos recursos florestais desta madeira, surge a necessidade de se estudar a potencial utilização de madeiras de outras origens botânicas, que não de carvalho, para utilização enológica, como é o caso da madeira de cerejeira e de acácia.

Assim, considerando os aspetos acima mencionados, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação comparativa da composição fenólica e da atividade antioxidante de diferentes extratos de madeira de cerejeira, de acácia e de carvalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizadas aparas de madeira de cerejeira (*Prunus avium L.*), acácia (*Robinia pseudoacácia L.*) e de carvalho de várias origens: Americano (*Quercus alba L.*), Francês (*Quercus robur L.*) e Português (*Quercus pyrenaica L.*). As aparas apresentavam uma dimensão média de 8 mm e uma tosta média. A partir de cada uma destas aparas de madeira foram elaborados extratos em duplicado utilizando soluções modelo de vinho (12%; pH 3.5), com 2 tempos de extração (15 e 30 dias) e a uma dose de aparas de 4 g/L.

2.2. Metodologias

Os compostos fenólicos individuais foram analisados por HPLC/DAD, tendo sido quantificados dois taninos elágicos e o ácido elágico recorrendo à metodologia descrita por VIRIOT *et al.* (1994), bem como outros 15 diferentes compostos fenólicos seguindo as condições descritas por PÉREZ *et al.* (2008). A atividade antioxidante foi efectuada utilizando duas metodologias: FRAP (BENZIE e STRAIN, 1996) e ABTS⁺ (RIVERO PÉREZ *et al.* 2007). A determinação do potencial redox, isto é, a tendência para os componentes serem oxidados ou reduzidos foi realizado com um potenciómetro Crison MicripH2001. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na figura 1 são apresentados exemplos de perfis cromatográficos obtidos a diferentes comprimentos de onda a partir dos extratos analisados. Pela observação destes perfis, constata-se a existência de evidentes diferenças, destacando-se o extrato de madeira de cerejeira (perfil E) com uma potencial menor diversidade em compostos fenólicos.

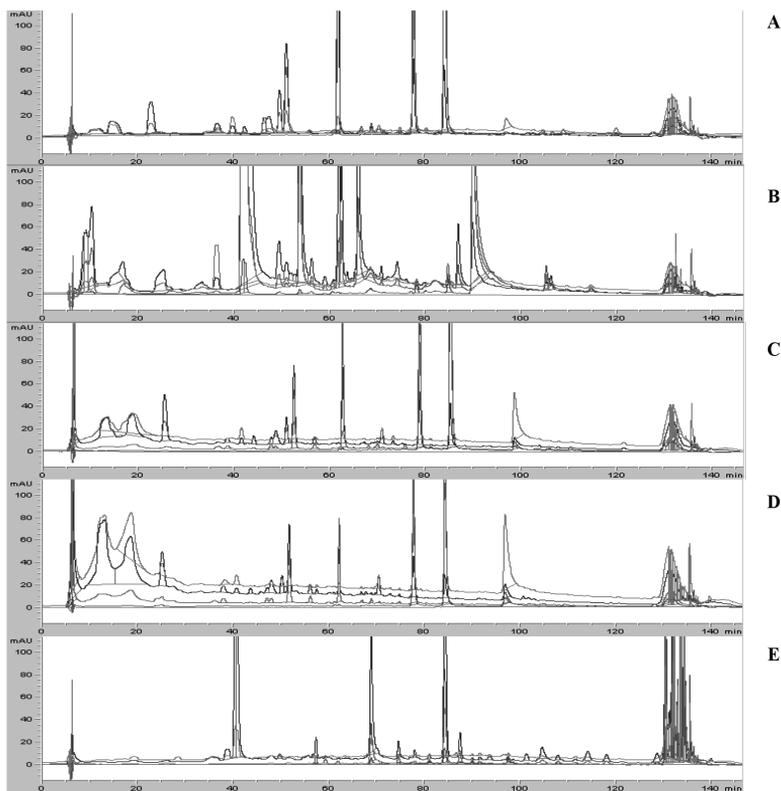


Figura 1 Perfis cromatográficos dos diferentes extratos de aparas de madeira de carvalho americano (A), acácia (B), carvalho francês (C), carvalho português (D) e cerejeira (E), obtidos a diferentes comprimentos de onda (254, 280, 320, 360 e 520 nm).

No caso dos extratos de madeira de acácia (perfil B), o perfil obtido perspectiva a existência de uma maior diversidade de compostos, comparativamente ao observado

nos restantes extratos. A partir destes cromatogramas, foram quantificados vários compostos fenólicos individuais presentes nos diferentes extratos de madeira após 15 e 30 dias de extração (quadro 1).

Dos resultados obtidos, foi possível observar que foi nos extratos de aparas de madeira de cerejeira que ocorreu um menor número de compostos quantificados (ácido p-cumárico, (+)catequina, naringenina e ácido elágico) nomeadamente em relação aos extratos de madeira de carvalho. De salientar que só nos extratos de madeira de cerejeira foi possível identificar a (+)catequina e a naringenina.

Quadro 1 Teores médios em compostos fenólicos individuais quantificados (mg/L) nos extratos de aparas de madeira de cerejeira, acácia e de carvalho após 15 e 30 dias de extração.

Compostos	Cerejeira		Acácia		Francês		Carvalho Americano		Português	
	15d ⁽⁶⁾	30d ⁽⁷⁾	15d	30d	15d	30d	15d	30d	15d	30d
Aldeído protocatético ⁽¹⁾	nd	nd	4.80 ±0.17	1.4 ±0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido gálico	nd	nd	nd	nd	1.07 ±0.05	1.25 ±0.02	nd	nd	1.31 ±0.1	1.44 ±0.07
Ácido vanílico	nd	nd	nd	nd	0.09 ±0.01	0.14 ±0.02	0.30 ±0.04	0.33 ±0.01	0.129 ±0.002	0.128 ±0.003
Ácido siringico	nd	nd	nd	nd	0.41 ±0.01	0.44 ±0.07	0.66 ±0.04	0.83 ±0.01	0.27 ±0.01	0.22 ±0.02
(+)-Catequina	18.86 ±0.55	18.51 ±0.08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Robinetina ⁽²⁾	nd	nd	73.39 ±2.67	118.94 ±0.28	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzaldeído	nd	nd	nd	nd	11.45 ±0.64	11.44 ±0.54	19.07 ±1.63	12.68 ±1.08	5.72 ±0.84	7.93 ±0.78
Fustina ⁽²⁾	nd	nd	0.53 ±0.09	0.86 ±0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butina ⁽²⁾	nd	nd	2.32 ±0.08	3.52 ±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Robtina ⁽²⁾	nd	nd	1.73 ±0.05	3.05 ±0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido <i>p</i> -cumárico	132.1 ±1.1	172.5 ±11.7	nd	nd	150.9 ±26.2	153.4 ±1.6	299.5 ±11.8	nd	93.3 ±2.7	84.3 ±1.8
Coniferaldeído ⁽³⁾	nd	nd	nd	nd	1.33 ±0.06	1.42 ±0.27	1.40 ±0.06	1.35 ±0.02	0.96 ±0.03	0.90 ±0.02
Siringaldeído ⁽⁴⁾	nd	nd	nd	nd	0.09 ±0.02	0.109 ±0.001	0.19 ±0.04	nd	0.12 ±0.01	0.11 ±0.01
Quercetina	nd	nd	nd	nd	4.74 ±0.25	5.45 ±1.12	5.41 ±0.28	5.49 ±0.06	2.53 ±0.07	2.48 ±0.05
Naringenina	4.14 ±0.13	5.54 ±0.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vescalagina ⁽⁵⁾	nd	nd	nd	nd	18.92 ±2.54	19.21 ±1.96	5.87 ±0.98	6.21 ±1.21	23.46 ±1.73	25.74 ±1.54
Castalagina ⁽⁵⁾	nd	nd	nd	nd	21.45 ±3.4	24.97 ±2.87	6.21 ±1.34	5.43 ±0.87	27.89 ±1.12	32.45 ±2.96
Ácido elágico	nd	0.72 ±0.03	nd	0.049 ±0.004	3.31 ±0.21	3.49 ±0.12	1.23 ±0.09	1.17 ±0.05	4.47 ±0.43	4.91 ±0.27
Total	155.1	197.27	82.77	127.81	213.76	221.31	339.84	33.49	160.15	160.60

⁽¹⁾ expresso em equivalentes de ácido protocatético; ⁽²⁾ expresso em equivalentes de naringenina; ⁽³⁾ expresso em equivalentes de sinapaldeído; ⁽⁴⁾ expresso em equivalentes de ácido siringico; ⁽⁵⁾ expresso em equivalentes de ácido elágico; ⁽⁶⁾ 15 dias de extração; ⁽⁷⁾ 30 dias de extração; nd - não detetado.

O ácido p-cumárico e o ácido elágico foram os únicos compostos comuns detetados nos extratos de cerejeira e de carvalho. Os resultados obtidos confirmam anterior trabalho de SANZ *et al.* (2010), que ao estudarem a madeira de cerejeira (já com tosta) quantificaram também estes compostos como maioritários. No entanto, de acordo com FERNÁNDEZ DE SIMÓN *et al.* (2014), nas madeiras de cerejeira e de acácia é ainda possível encontrar outros compostos, nomeadamente fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e derivados da lenhina. Para os extratos de madeira de acácia, foram quantificados também alguns

compostos presentes só nestes extratos, como sejam, o aldeído protocatético, a robinetina, a fustina, a butina e a robtina. Os compostos quantificados nos extratos das diferentes madeiras de carvalho foram compostos fenólicos de baixo peso molecular, resultantes nomeadamente da termodegradação da lenhina durante o processo de queima.

De salientar ainda que os valores encontrados para a generalidade dos compostos apresentaram uma grande variação tendo em conta outros trabalhos já publicados. Este aspeto, resulta de vários fatores, nomeadamente das diferentes concentrações de aparas que são utilizadas nos diversos estudos, o tempo de maceração, a dimensão e origem das aparas, o tipo de queima e ainda as metodologias analíticas empregues. No caso dos 2 tempos de extração utilizados neste trabalho (15 e 30 dias), foi constatada que para vários compostos não ocorreu uma tendência geral bem definida, sendo no entanto que para alguns compostos (por exemplo, ácido p-cumárico, naringenina, ácido gálico e ácido elágico) ocorreu um aumento ligeiro dos valores detetados com o aumento do tempo de extração (excepto nos extratos de madeira de carvalho americano onde após 30 dias já não foi quantificado o ácido p-cumárico), enquanto que para outros compostos o aumento do tempo de extração conduziu a um decréscimo do valores quantificados (por exemplo, aldeído protocatético). Neste sentido SANZ *et al.* (2012), referem que os teores em aldeído protocatético tendem a diminuir durante o tempo de estágio do vinho em madeira. Por outro lado, JORDÃO *et al.* (2005) referem que entre os 25 e os 30 dias se atinge o máximo de extração dos taninos elágicos a partir de aparas de madeira de carvalho em soluções hidroalcoólicas, seguindo-se posteriormente um decréscimo dos valores como resultado de fenómenos de degradação destes compostos.

A presença de compostos fenólicos é um factor determinante na capacidade antioxidante dos vinhos estagiados em contacto com a madeira (GONÇALVES e JORDÃO, 2009). Na figura 2, são apresentados os resultados obtidos para a atividade antioxidante dos diferentes extratos de madeira avaliada por duas metodologias.

Os resultados indicam valores significativamente mais elevados de atividade antioxidante nos extratos de madeira de carvalho português, francês e de acácia. Os extratos de madeira de cerejeira e de carvalho americano foram os que apresentaram valores de atividade antioxidante significativamente mais baixos. Salientese que os valores da atividade antioxidante resultam fundamentalmente da composição fenólica presente nas madeiras, não só em termos globais como ainda, do tipo de compostos fenólicos presentes, visto cada composto fenólico individual apresenta uma atividade antioxidante diferente.

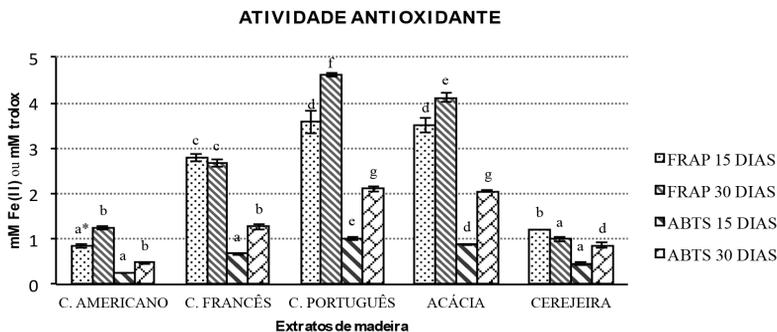


Figura 2 Valores médios da atividade antioxidante recorrendo à metodologia FRAP (mM Fe (II)) e ABTS⁺ (mM trolox) em extratos de aparas de madeira de carvalho, acácia e cerejeira após 15 e 30 dias de extração.

* Valores médios com a mesma letra, para os diferentes extratos e mesmo método de avaliação da atividade antioxidante, não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Assim, após 30 dias de extração, a capacidade antioxidante (avaliada pelo método FRAP) apresentada pelos extratos de carvalho francês (2.67 mM Fe (II)) e português (4.61 mM Fe (II)) ao contrário dos extratos de carvalho americano (1.24 mM Fe (II)) poderá resultar de teores mais elevados em taninos elágicos e de ácido elágico, tal como foi já reportado por outros autores (CADAHÍA *et al.* 2001; JORDÃO *et al.* 2007; 2012). Por outro lado, embora se tenha obtido valores elevados de atividade antioxidante para os extratos de madeira de acácia (4.11 mM Fe (II)) e sendo por exemplo os teores em taninos elágicos e de ácido elágico quantificado nestes extratos sido praticamente residuais (quadro 1), tal facto poderá ser explicado pela existência de outros grupos de compostos fenólicos específicos desta espécie com elevado potencial antioxidante. Este aspeto, é suportado ainda pelo facto de alguns autores (PASHEVA *et al.* 2013) terem verificado em soluções hidroalcoólicas, valores de atividade antioxidante superiores em extratos de madeira de acácia relativamente aos valores quantificados em extratos de madeira de carvalho francês. Salientese também, que no geral os valores da atividade antioxidante nos diferentes extratos apresentaram um incremento dos valores com o aumento do tempo de extração, o que poderá resultar de um aumento da extração dos principais compostos fenólicos com poder antioxidante.

Para o potencial redox, os resultados apresentados na figura 3, permitem constatar valores significativamente mais elevados nos extratos das madeiras de carvalho comparativamente aos valores encontrados nos extratos de madeira de acácia e de cerejeira. Esta diferença foi fundamentalmente observada nos extratos obtidos após 15 dias de extração.

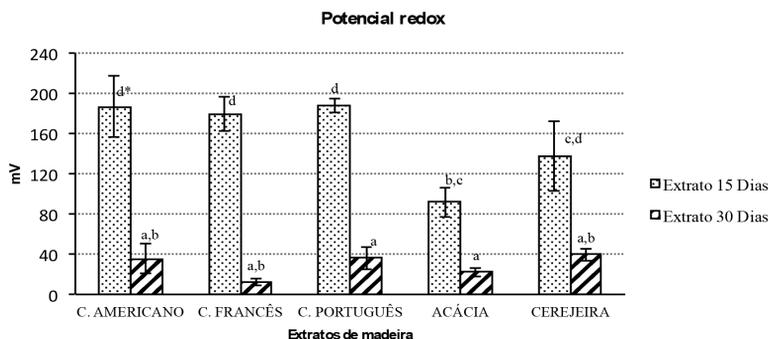


Figura 3 Valores médios do potencial redox em extratos de aparas de madeira de carvalho, acácia e cerejeira após 15 e 30 dias de extração.

* Valores médios com a mesma letra, para os diferentes extratos não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A existência destas diferenças entre os vários extratos pode ser explicada, entre outros aspetos, pelos valores mais elevados em taninos elágicos (vescalagina e castalagina), ácido elágico, quercitina e ácido p-cumárico, presente nos extratos de madeira de carvalho. No caso dos extratos obtidos após 30 dias de extração, as diferenças entre os extratos das diferentes madeiras foram no geral mais atenuadas.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho verificouse a existência de diferenças bem marcadas entre a composição fenólica das aparas de madeira de acácia e de cerejeira relativamente às madeiras de carvalho, através de uma menor diversidade de compostos fenólicos detectados nos extratos das primeiras. Relativamente à atividade antioxidante, os extratos de madeira de cerejeira evidenciaram valores significativamente inferiores aos restantes. Os resultados apontam para alguma especificidade das aparas de madeira de cerejeira e de acácia em termos fenólicos, podendo tal facto contribuir para que os vinhos a estagiar em contato com estas madeiras possam ter características químicas e sensoriais próprias.

AGRADECIMENTOS

AEB Bioquímica Portuguesa S.A., pela cedência de algumas das amostras de aparas de madeira utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENZIE, I.F.F, STRAIN, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Bioch.*, 239:7076.
- CABRITA, M.J., DIAS, C.B., FREITAS, A.M.C. (2011). Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. French oaks. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 32:204210.
- CADAHÍA, E., VAREA, S., MUÑOZ, L., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., GARCÍAVALLEJO, M.C. (2001). Evolution of ellagitannins in Spanish, French and American oak wood during natural seasoning and toasting. *J. Agric. Food Chem.*, 49:36773684.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., SANZ, M., CADAHÍA, E., ESTERUELAS, E., MUÑOZ, A.M. (2014). Nontargeted GCMS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood. *J. Mass Spectrom.*, 49:353370.
- GONÇALVES, F., JORDÃO, A.M., (2009). Changes in antioxidant activity and the proanthocyanidin fraction of red wine aged in contact with Portuguese (*Quercus pyrenaica* Willd.) and American (*Quercus Alba* L.) oak wood chips. *Ital. J. Food Sci.*, 1:5164.
- JORDÃO, A.M., RICARDODASILVA, J.M., LAUREANO, O. (2005). Extraction of some ellagic tannins and ellagic acid from oak wood chips (*Quercus pyrenaica* L.) in model wine solutions: effect of time, pH, temperature and alcoholic content. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2:8389.
- JORDÃO, A.M., RICARDODASILVA, 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*, 61:155160.
- JORDÃO, A.M., CORREIA, A.C., DEL CAMPO, R., GONZÁLEZSANJOSÉ, M.L. (2012). Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *Eur. Food Res. Technol.*, 235:817825.
- PASHEVA, M., NASHAR, M., PAVLOV, D., SLAVOVA, S., IVANOV, D., IVANOVA, D. (2013). Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alcoholic beverages in Bulgaria. *Sci. Technol.*, 3:123127.
- PÉREZ, S., ORTEGA, M., CANO, E. (2008). Optimization of a solidphase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 56:1156011570.
- RIVEROPÉREZ, M.D., MUÑIZ, P., GONZÁLEZSANJOSÉ, M.L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J. Agric. Food Chem.*, 55:54765483.
- SANZ, M., CADAHÍA, E., ESTERUELAS, E., MUÑOZ, A.M., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., HERNÁNDEZ, T., ESTRELLA, I. (2010). Phenolic compounds in cherry (*Prunus avium*) heartwood with a view to their use in cooperage. *J. Agric. Food Chem.*, 58:49074914.
- SANZ, M., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., ESTERUELAS, E., MUÑOZ, AM., CADAHÍA, E.,

- HERNÁNDEZ, T., ESTRELLA, I., MARTÍNEZ, J. (2012). Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Anal. Chim. Acta*, 732:8390.
- 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*, 36:12531260.



AValiação DO EFEITO DA ADIÇÃO DE VÁRIOS PRODUTOS ENOLÓGICOS NA ESPUMA DO VINHO ESPUMANTE

Elisabete COELHO⁽¹⁾; Catarina EUSÉBIO⁽¹⁾; Filipe CENTENO⁽²⁾; Maria de Fátima TEIXEIRA⁽²⁾; Francisco ANTUNES⁽³⁾; Manuel A. COIMBRA⁽¹⁾

RESUMO

Com o objetivo de melhorar as propriedades da espuma dos vinhos espumantes, foram produzidos nove vinhos usando dois produtos enológicos: Optimum White® e OptiRED®. A partir de três vinhos base (controlo, vinho base que fermentou com Optimum White®, e vinho base onde foram usadas *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii*). Cada um dos vinhos base foi dividido na segunda fermentação em três modalidades: vinho espumante sem adição de produtos enológicos, vinho espumante com adição de Optimum White® e vinho espumante com adição de OptiRED®. Foram avaliadas as propriedades de espuma de todos os vinhos espumantes produzidos usando uma metodologia baseada no aparelho Mosalux.

Os vinhos espumantes que apresentaram incrementos significativos no volume e estabilidade da espuma foram os vinhos com adição de Optimum White® na primeira fermentação, independentemente do produto enológico usado na segunda fermentação, e o vinho base controlo com adição do produto enológico OptiRED® na 2ª fermentação. Os vinhos espumantes que apresentaram melhores propriedades de espuma foram os que tinham concentrações elevadas de manoproteínas, 2,7-4,1 g. L⁻¹. A análise sensorial revelou uma preferência para o vinho com adição de Optimum White® nas duas fermentações e também para os vinhos que estiveram em contacto com este produto enológico durante a primeira fermentação.

A maior quantidade de manoproteínas do produto enológico Optimum White® parece favorecer as propriedades da espuma dos vinhos espumantes, principalmente se utilizado na primeira fermentação.

PALAVRAS-CHAVE – Vinho espumante, volume de espuma, estabilidade da espuma, produtos enológicos, manoproteínas.

⁽¹⁾ QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal. (ecoelho@ua.pt)

⁽²⁾ Proenol, Indústria Biotecnológica, Lda, Travessa das Lages, 267, 4405-194 Canelas, Vila Nova de Gaia, Portugal.

⁽³⁾ Aliança Vinhos de Portugal, S.A., Rua do Comércio, 444, 3781-908 Sangalhos, Portugal.

1- INTRODUÇÃO

As características sensoriais mais importantes dos vinhos espumantes incluem as propriedades da espuma percebidas pelo consumidor (MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009). Vários estudos foram realizados na tentativa de estabelecer os compostos que influenciam as propriedades de espuma, nomeadamente a quantidade e a estabilidade. As proteínas e os polissacarídeos estão geralmente associadas a contributos positivos nas propriedades de espuma (BRISSONNET e MAUJEAN, 1991, LÓPEZ-BARAJAS *et al.*, 1997, MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2000, COELHO *et al.*, 2011). Estas manoproteínas são libertadas pelas leveduras durante a autólise e contêm um elevado grau de glicosilação, com mais de 90% de açúcares, essencialmente manose. Desse modo, a investigação de estirpes que libertem grandes quantidades de manoproteínas é uma estratégia para melhorar a qualidade do vinho espumante. Com a finalidade de aumentar a quantidade de manoproteínas libertada durante a fermentação alcoólica, têm sido desenvolvidas estirpes mutantes de *S. cerevisiae* (GONZALEZ-RAMOS e GONZALEZ, 2006, GONZALEZ- RAMOS *et al.*, 2008, DOMIZIO *et al.*, 2014). Outras leveduras não *Saccharomyces* têm também uma elevada capacidade para libertar manoproteínas, muitas destas promovendo uma maior complexidade de aroma e uma melhor qualidade global ao vinho (DOMIZIO *et al.*, 2011, DOMIZIO *et al.*, 2014). As estirpes que sobre-expressam manoproteínas produzem vinhos com maior estabilidade quando comparadas com o vinho produzido por estirpes nativas (GONZALEZ-RAMOS e GONZALEZ, 2006, QUIRÓS *et al.*, 2010, DOMIZIO *et al.*, 2014).

O envelhecimento sobre as borras tem demonstrado contribuir favoravelmente para a estabilidade e qualidade dos vinhos, no entanto é um processo lento e economicamente desfavorável, promovendo assim o uso de produtos enológicos contendo os derivados de levedura que são produzidos durante a autólise. Estes produtos enológicos são obtidos a partir de leveduras enológicas (*S. cerevisiae*) através de plasmólise autolítica ou processos de hidrólise (POZO-BAYÓN *et al.*, 2009).

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Vinificação

As uvas da casta tinta Castelão provenientes da vindima de 2014, Quinta dos Loridos, Bombarral, foram vinificadas em vinhos espumantes brancos. O mosto resultante da prensagem de 0,2 bar foi decantado e transferido para 3 cubas de 100 hL. Na primeira cuba (Aff) foi realizada uma fermentação controlo, apenas com a adição de leveduras livres de *S. cerevisiae* (Affinity® ECA5), na dose de 20 g.hL⁻¹. Na segunda cuba (AffOW) houve a inoculação da mesma levedura livre, na mesma dose, em conjunto com a adição de um produto enológico, o Optimum White®, na dose de 30 g.hL⁻¹. Na terceira cuba (AffBd) foi inoculada a levedura *T. delbrueckii* (Biodiva™ TD291), na concentração de 25 g.hL⁻¹ e após o abaixamento de 15 g.cm⁻³ na massa volúmica do mosto foi inoculada a levedura *S. cerevisiae* (Affinity® ECA5), na mesma concentração descrita.

Para a segunda fermentação foram usados: 1) 40 L de vinho de cada um dos vinhos base sem adição de produtos enológicos, representando este o vinho controlo; 2) 40 L de vinho de cada um dos vinhos base com adição uma solução de Optimum White®, na concentração final de 40 g.hL⁻¹; e 3) 40 L de vinho de cada um dos vinhos base com adição de OptiRED®, na concentração final de 40 g.hL⁻¹. Para a segunda fermentação foram utilizadas leveduras imobilizadas em esferas de alginato, ProElif (1,2 - 1,3 g por garrafa). De cada uma das nove variáveis de vinho foram obtidas cerca de 40 garrafas (Figura 1).

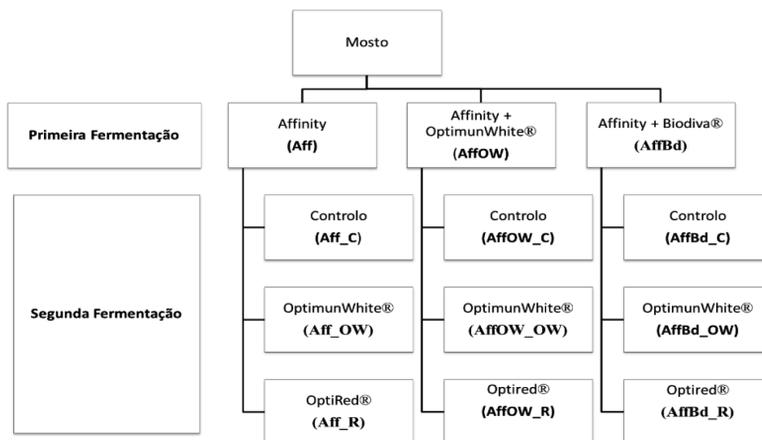


Figura 1 - Esquema geral do processo de vinificação realizado.

2.2 - Análise de açúcares

A análise de açúcares neutros das várias amostras foi realizada segundo o método de SELVENDRAN *et al.* (1979), após hidrólise ácida dos polissacarídeos. Após hidrólise, os resíduos são convertidos a acetatos de alditol seguido de análise por cromatografia em fase gasosa. A quantificação dos ácidos urónicos (AU) foi realizada por adaptação do método colorimétrico proposto por BLUMENKRANTZ e HABOE-HANSEN, (1973).

2.3 - Medição das propriedades da espuma

A capacidade de formação de espuma e a sua estabilidade foram avaliadas através de uma adaptação do método de Mosalux Bikerman (PUEYO *et al.*, 1995). A capacidade de espuma foi avaliada como o aumento na altura de 10 mL de soluções de vinho colocadas no interior de uma coluna de vidro, após a injeção de CO₂. Para avaliar o volume da espuma, dois parâmetros foram avaliados: 1) HM

(altura máxima atingida pela espuma após a injeção de CO₂ através coluna de vidro, expresso em cm) representa a capacidade de formação de espuma; 2) HS (altura de estabilidade da espuma durante a injeção de CO₂, expressa em cm) representa a capacidade do vinho para produzir um colar de espuma persistente e estável. O tempo de estabilidade da espuma (TS) foi avaliado como o tempo decorrido para o colapso das bolhas necessárias ao aparecimento de líquido depois de cessar o fornecimento de CO₂ e é expresso em segundos (s).

2.4 - Análise sensorial

Após a segunda fermentação ter terminado foi efetuada por uma prova cega aos vinhos espumantes, constituída por 11 provadores. Os atributos da espuma foram classificados, quanto à sua quantidade, estabilidade e efervescência. Os vinhos foram também avaliados numa escala hedónica de 0 a 20 quanto à apreciação global.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Polissacarídeos dos vinhos espumantes

A fração de elevado peso molecular (HMW) dos vinhos base apresentam como açúcares maioritários a manose (Man) e a galactose (Gal) (Tabela 1), proveniente dos polissacarídeos das leveduras e das uvas respetivamente. A adição de produtos enológicos aumenta o teor em manose, proveniente das manoproteínas, face ao vinho base controlo, sendo este aumento mais pronunciado com o uso do produto Biodiva™. Este produto consiste no uso da estirpe *T. delbruekii*, sendo que esta apresenta uma elevada capacidade de libertação de manoproteínas (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2015).

O vinho espumante controlo (Aff_C) foi o que apresentou uma percentagem mais baixa de Man (67%). Este vinho não sofreu adição de nenhum produto enológico na primeira e segunda fermentação, apresentando menor percentagem de polissacarídeos com origem nas leveduras. O vinho Aff_OW devido à adição do produto enológico Optimum White® libertou para o vinho uma fração extra de manoproteínas, obtendo-se um total de 75% de Man. A amostra Aff_R, também proveniente do mesmo vinho base com a adição de OptiRED® na segunda fermentação apresentou o teor mais elevado em manoproteínas (83%), sendo a concentração total de hidratos de carbono (HC) (541 µg.mg⁻¹) superior ao das outras modalidades de vinho espumante (414; 443 µg.mg⁻¹).

As três variantes de vinho espumante provenientes do vinho base AffOW apresentaram uma concentração total de HC no HMW de 65-66%. Os três vinhos espumantes resultantes do vinho base ao qual foi adicionado Optimu White®, apresentaram uma percentagem de Man muito semelhante (80-82%). A adição dos produtos enológicos na segunda fermentação, após o vinho base ter sido fermentado com o Optimu White®, não traz diferenças significativas na quantidade de manoproteínas do vinho final das 3 modalidades.

Os rendimentos em HC do HMW dos vinhos espumantes provenientes do vinho base AffBd variaram entre 19-29%. O vinho AffBd_OW é o que apresenta uma maior quantidade de manoproteínas (80%), um pouco acima da AffBd_C (77%) e da AffBd_R (76%).

Tabela 1 - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) das frações de alto peso molecular dos vinhos base e das nove modalidades de vinho espumante.

Vinho	η (% m.v ⁻¹)	η HC (% m.v ⁻¹)	Hidratos de Carbono (% mol)							Total HC $\mu\text{g.mg}^{-1}$
			Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU	
Vinhos Base										
Affinity	23	37		14	14	29	26	12	4	366
Affinity + Optimun White®	25	52	1	12	6	38	33	3	4	525
Affinity + Biodiva™	19	60	1	5	7	67	17	1	2	559
Vinhos espumantes										
Affinity										
Aff_C	16	17	1	2		67	11	2	17	414
Aff_OW	14	18		2		75	11	3	9	443
Aff_R	20	49		2	2	83	4	2	7	541
Affinity + Optimun White®										
AffOW_C	21	26	1	3		82	9	4	1	648
AffOW_OW	15	27	1	2		80	12	2	3	663
AffOW_R	22	26		2		82	10	3	3	660
Affinity + Biodiva™										
AffBd_C	15	29		3		77	14	5	1	669
AffBd_OW	19	21		3		80	11	4	2	522
AffBd_R	30	19	1	1	2	76	6	3	11	466

3.2 - Avaliação das propriedades de espuma dos vinhos

3.2.1 - Propriedades de espuma do vinho base

Após a primeira fermentação foram avaliados os três parâmetros de espuma (HM, HS e TS), estando os valores representados na Figura 2.

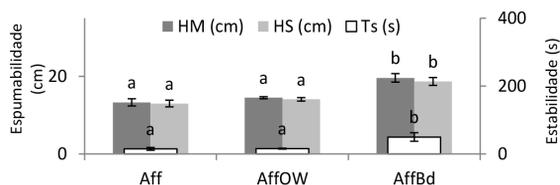


Figura 2 - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ($p>0,005$) dentro de cada parâmetro de espuma.

A avaliação do vinho controlo (Aff) e a do vinho com adição do produto enológico (AffOW) obtiveram resultados semelhantes em todos os parâmetros de altura e estabilidade da espuma (13,3 e 14,5 cm para a HM, 13 e 14,1 cm para HS e 15 e 16 s para a TS, respetivamente). A fermentação com as duas leveduras foi, no fim da primeira fermentação, a modalidade de vinho base mais promissora, apresentando valores de espumabilidade e estabilidade muito superiores aos restantes vinhos base. O valor de HM registado foi de 19,6 cm e o HS foi de 18,7 cm, 49% e 44% superior ao valor obtido no vinho base controlo, respetivamente. Este vinho apresentava uma maior percentagem em manoproteínas (Tabela 1) do que os restantes vinhos base. Como a *T. delbruekii* apresenta uma elevada capacidade de libertação de manoproteínas, pode ter aumentado a espumabilidade e estabilidade da espuma (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2015). O valor de TS deste vinho base (AffBd) foi o valor que mais aumentou comparativamente com o controlo (Aff), tendo o seu resultado sido de 50 s, o que representa um aumento de 233%.

3.2.2 - Propriedades da espuma do vinho espumante

Na figura 3 podemos observar que o vinho com os melhores parâmetros de espuma é o AffOW_C, seguindo do Aff_R, AffOW_R e do AffOW_OW. É possível verificar que os vinhos espumantes obtidos a partir do vinho base com adição de Optimum White® obtiveram todos elevados valores de HM, HS e TS independentemente do tipo de segunda fermentação realizada. A adição do produto OptiRED® ao vinho base controlo também se mostrou bastante eficaz na obtenção de um vinho com elevados parâmetros de HM, HS e TS. Os vinhos com piores valores de HM, HS e TS foram os AffBd_R, AffOW_R, Aff_C e Aff_R. A adição de OptiRED®, revelou ser pouco eficaz na produção de vinhos com elevada qualidade de espuma, com exceção do vinho

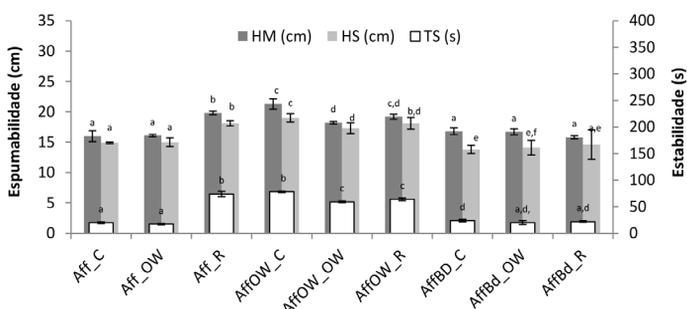


Figura 3 - Valores de HM, HS e TS dos nove vinhos espumantes obtidos. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ($p > 0,005$) dentro de cada parâmetro.

3.3 - Relação entre as propriedades da espuma e a concentração de manoproteínas dos vinhos espumantes

As manoproteínas são um dos principais compostos relacionados com a espuma devido às suas propriedades tensioativas (BLASCO *et al.*, 2011, COELHO *et al.*, 2011, MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2015). A relação entre os parâmetros de espuma e a quantidade de manoproteínas (Figura 3 e Tabela 1) é apresentada na Figura 4, verificando-se que os vinhos com as concentrações mais baixas de Man ($1,3-1,5 \text{ g.L}^{-1}$) apresentam os menores valores de HM (16 cm). É possível verificar que os HM elevados são atingidos na gama de $2,7-4,1 \text{ g.L}^{-1}$ de Man, exceto o vinho espumante Aff_R. O vinho Aff_R apresenta um HM de 19,8 cm, com concentração de Man de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$, indicando que a quantidade de manoproteínas não é o único fator a influenciar a quantidade de espuma formada, o mesmo se verificando para a estabilidade da espuma, onde os vinhos AffOW_C e Aff_R apresentam elevados TS com concentração de Man de $3,8$ e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$, respetivamente.

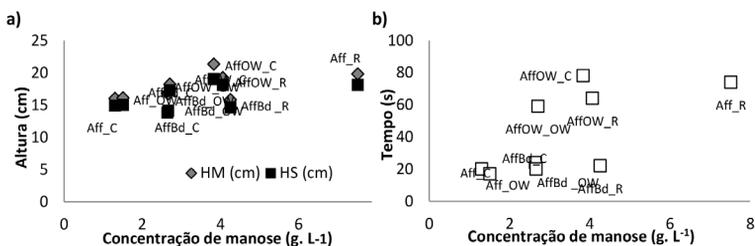


Figura 4 - Relação entre a concentração de manoproteínas nos vinhos e a sua espumabilidade HM e HS (cm) e estabilidade TS (s).

3.4 - Apreciação global dos vinhos espumantes

O vinho AffOW_OW obteve a nota mais elevada, 17,5 valores, seguido do AffOW_C, com 17 (Figura 5). Estes dois vinhos foram considerados pelos provadores como intensos, florados, frutados e mediamente frescos. Relativamente ao gosto, ambos foram considerados ácidos, pouco amargos e com elevada persistência de sabor.

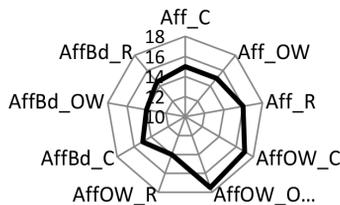


Figura 5 - Avaliação da apreciação global do vinho espumante.

4 – CONCLUSÕES

O conteúdo em manoproteínas está diretamente relacionado com a espumabilidade e estabilidade da espuma. Apesar de existir uma relação entre a quantidade de manoproteínas e os valores de HM e HS, a partir de valores de concentração superiores a 4,1 g. L⁻¹ não se verificou um incremento significativo nesses valores.

O vinho com adição de Optimum White[®] durante a primeira fermentação, sem adição de nenhum produto durante a segunda (AffOW_C) foi a modalidade produzida que apresentou valores mais elevados de HM, HS e TS. O vinho AffOW_OW, adição do produto Optimum White[®] durante as duas fermentações, foi o vinho que obteve maior preferência global por parte dos provadores, obtendo uma avaliação de 17,5 valores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blasco L, Viñas M, Villa TG (2011). *Int. Microbiol.*, 14, 61. Brissonnet F, Maujean A (1991). *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 97.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973). *Analytical Biochemistry*, 54, 484.
- Coelho E, Reis A, Domingues MRM, Rocha SM, Coimbra MA (2011). *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3168.
- Domizio P, Liu Y, Bisson LF, Barile D (2014). *Food Microbiol.*, 43, 5.
- Domizio P, Romani C, Comitini F, Gobbi M, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011). *Ann. Microbiol.*, 61, 137.
- Gonzalez-Ramos D, Cebollero E, Gonzalez R (2008). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5533. Gonzalez-Ramos D, Gonzalez R (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9411.
- López-Barajas M, Viu-Marco A, López-Tamames E, Buxaderas S, Torre-Boronat M.C. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2526.
- Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B, Pérez-Magariño S (2015). *Food Chem.*, 174, 330.
- Moreno-Arribas MV, Polo MC, Wine chemistry and biochemistry, vol. 378. Springer, 2009.
- Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto FJ, Martín-Álvarez PJ, Polo MC (2000). *Food Chem.*, 70, 309.
- Pozo-Bayón MA, Andújar-Ortiz I, Moreno-Arribas MV (2009). *Food Res. Int.*, 42, 754. Pueyo E, Martín-Álvarez PJ, Polo MC (1995). *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 518–524.
- Quiros M, Gonzalez-Ramos D, Tabera L, Gonzalez R (2010). *Int. J. Food Microbiol.*, 139,9.
- Selvendran RR, Marc, JF, Ring SG (1979). *Anal. Biochem.*, 96, 282.

CARATERIZAÇÃO SENSORIAL E FENÓLICA DE VINHOS TINTOS MONOVARIETAIS PRODUZIDOS COM CASTAS TINTAS CULTIVADAS NA REGIÃO DEMARCADA DO DOURO

Alice VILELA^{1*}; Ângela LIQUITO²; Fernanda COSME¹

RESUMO

As castas Touriga Nacional, Touriga Franca, Sousão, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon são castas

importantes cultivadas na Região Demarcada do Douro e características dos vinhos produzidos nessa região. Este trabalho pretende contribuir para uma melhor caracterização sensorial e fenólica dos vinhos monovarietais obtidos dessas cinco castas, recorrendo a descritores e técnicas analíticas apropriadas. Para tal, procedeu-se ao treino de um painel de provadores, com soluções padrão de aromas extraídos de produtos naturais e testes de ordenação dos sabores elementares. O perfil sensorial de cada vinho foi obtido através de uma análise descritiva quantitativa. Dos resultados obtidos na Análise de Clusters e Análise em Componentes Principais, foi possível observar a formação de grupos que distinguem os vinhos monovarietais entre si. Para a formação destes grupos contribuíram o descritor *pimento verde*, característico dos vinhos monovarietais da casta Cabernet Sauvignon e os descritores *aroma floral* e *aroma frutado* característicos dos vinhos monovarietais da casta Touriga Nacional. O vinho da casta Touriga Franca é caracterizado pela sua intensidade aromática enquanto, o vinho da casta Sousão se distingue por apresentar uma cor mais intensa.

Palavras-chave: Região Demarcada do Douro, Touriga Nacional, Touriga Franca, Sousão, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, perfil sensorial.

⁽¹⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Biologia e Ambiente - Edifício de Enologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.
*avimoura@utad.pt

⁽²⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

1. INTRODUÇÃO

Os vinhos tintos da Região Demarcada do Douro (RDD) são tradicionalmente produzidos a partir de castas autóctones como a Touriga Nacional, Touriga Franca, Tinta Roriz (Aragonez), Tinta Barroca e Tinto Cão. A grande maioria dos vinhos resulta de um lote obtido a partir da vinificação de várias castas, o que lhes confere uma complexidade e riqueza incomparáveis, e um perfil característico do Douro. Existem, contudo, ainda bons exemplos de vinhos monovarietais, produzidos apenas com uma casta, principalmente com as três primeiras (ANÓNIMO, 2013). Ao mesmo tempo, constata-se um aumento da representatividade de vinhos de castas francesas, como a Pinot Noir e a Cabernet Sauvignon. A casta Cabernet Sauvignon ganhou reputação especialmente em França, na região de Bordéus, mas o seu sucesso mundial surgiu quando os países vinícolas do novo mundo a começaram a plantar em larga escala. Assim, o presente trabalho pretende dar um contributo para um melhor conhecimento dos vinhos monovarietais de castas tintas cultivadas na RDD, nomeadamente da Touriga Nacional, Touriga Franca, Sousão, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinhos

Os vinhos monovarietais estudados foram vinificados a partir de cinco castas tintas cultivadas na RDD: Touriga Nacional, Touriga Franca, Sousão, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon. Todas as determinações analíticas aos vinhos foram efetuadas em duplicado.

2.2. Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

Determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não-flavonóides foram determinados de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais obtivemos os compostos fenólicos flavonóides. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração elaborada com o ácido gálico.

2.3. Antocianinas totais, intensidade e tonalidade corante

As antocianinas totais foram determinadas de acordo com RIBÉREAU-GAYON e STONESTREET (1965) e a intensidade e tonalidade corante de acordo com OIV (2013).

2.4. Análise Sensorial

2.4.1. Treino do painel de provadores

As amostras de vinho foram avaliadas por um painel de provadores, com experiência em análise sensorial e participação regular em provas de vinhos. As provas decorreram das 16.00-17.00 h, num laboratório de acordo com a norma ISO 8589:2007.

2.4.1.1 Testes discriminativos

Para o treino do painel foram elaborados testes sensoriais discriminativos, nomeadamente, testes de ordenação. Através destes testes foram avaliadas as diferenças sensoriais entre várias soluções de concentração crescente de sacarose, ácido tartárico e tanino (Quadro 1).

Quadro 1 - Concentrações das soluções utilizadas nos testes de ordenação

Concentração					
Sabor doce	Sacarose (g/L)	5	10	15	20
Sabor ácido	Ác. tartárico (g/L)	0,05	0,15	0,40	0,70
Sensação de adstringência	Tanino (mg/L)	20	40	80	160

2.4.1.2 Percepção de aromas

Para treino da acuidade olfativa dos provadores foram elaboradas soluções de aromas por maceração de produtos naturais em solução hidroalcoólica a 12% (v/v). Foi pedido aos provadores que avaliassem a intensidade aromática das soluções com a seguinte escala: *Intenso*; *Pouco intenso*; *Muito pouco intenso*.

2.4.2 Prova dos vinhos

Após treino do painel, procedeu-se à avaliação das amostras de vinho que foram apresentadas codificadas, com códigos de três dígitos, e servidas à temperatura ambiente, em copos apropriados (ISO 3591:1977). Foi fornecida água mineral e tostas para limpeza do palato entre a avaliação das amostras. Foi efetuada uma Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), utilizando-se fichas de prova com os seguintes descritores/atributos: Visuais (*Cor*, *Limpidez*); Olfativos (*Intensidade*, *Floral*, *Frutado*, *Frutos Secos*, *Frutos Cítricos*, *Especiarias*, *Pimento Verde*, *Madeira*, *Oxidado*); Gustativos (*Doçura*, *Amargo*, *Acidez*, *Taninos Adstringência*, *Corpo*); Olfato-gustativos ou flavor (*Intensidade*, *Flavor Floral*, *Flavor Frutado*, *Flavor Vegetal*) e Fim-de-boca (*Persistência*) com uma escala estruturada de 1 (pouco intenso) a 5 (muito intenso) pontos (ISO 4121:2003).

2.5 Análise estatística

Os resultados físico-químicos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao Teste de Tuckey a 5% de significância para comparação entre as médias. Aos dados da análise sensorial foi aplicada uma Análise em Componentes Principais (ACP) e Análise de *Clusters* (distância Euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair- group average*). A avaliação do perfil sensorial das amostras foi realizada através do gráfico

aranha. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* STATISTICA 2010 (Stat Soft Inc., 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides

O vinho da casta Touriga Nacional obteve a média mais elevada de compostos fenólicos totais (2290 g/L ácido gálico), enquanto o vinho da casta Pinot Noir apresentou a média mais baixa (2067 g/L ácido gálico). Para os compostos fenólicos não flavonóides, o vinho da casta Touriga Nacional apresentou os valores mais baixos (432 g/L ácido gálico), enquanto o vinho da casta Cabernet Sauvignon apresentou os valores mais elevados (555 g/L ácido gálico). Para os compostos fenólicos flavonóides, o vinho da casta Touriga Nacional obteve o valor mais elevado (1858 g/L ácido gálico) enquanto o vinho da casta Cabernet Sauvignon apresentou o valor mais baixo (1547 g/L ácido gálico), o que seria de esperar pelos valores obtidos nos dois parâmetros anteriores (Quadro 2).

Quadro 2 – Compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides dos vinhos monovarietais das cinco castas.

Vinhos*	Fenóis Totais (g/L ácido gálico)	Não-flavonóides (g/L ácido gálico)	Flavonóides (g/L ácido gálico)
Touriga Nacional	2290±57 ^b	432±12 ^a	1858±39 ^b
Touriga Franca	2102±51 ^{a, b}	494±1 ^{a, b}	1608±42 ^{a, b}
Sousão	2174±53 ^{a, b}	472±2 ^{a, b}	1702±38 ^{a, b}
Cabernet Sauvignon	2102±49 ^{a, b}	555±2 ^b	1547±36 ^a
Pinot Noir	2067±49 ^a	486±4 ^{a, b}	1582±16 ^a

* Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância)

3.4 Antocianinas totais, intensidade e tonalidade corante

O vinho da casta Sousão apresentou o valor mais elevado de intensidade corante em relação aos restantes vinhos (35,17 u.a), o que esta de acordo com GUERRA e ABADÉ (2008a; 2008b) e GUERRA (2009), já o vinho da casta Pinot Noir obteve o valor mais baixo de intensidade corante (6,52 u.a). Os vinhos das castas Touriga Nacional e Touriga Franca obtiveram valores de 17,10 e 13,57 u.a., de intensidade corante

respetivamente, indo de encontro ao referido na literatura por TRIGO (2008), que é na ordem de 10-20 u.a, para a casta Touriga Nacional e de 5,80-25,62 u.a, para a Touriga Franca (Quadro 3). Pelo contrário, a tonalidade corante, do vinho da casta Pinot Noir apresentou o valor mais alto (0,76) e os vinhos das castas Sousão e Cabernet Sauvignon o valor mais baixo (0,52), o que está de acordo com TEIXEIRA (2008). Entretanto, o vinho da casta Sousão obteve o valor mais elevado de antocianinas totais (1205 mg/L) o que está de acordo com GUERRA e ABADE (2008a; b) e TEIXEIRA (2008), com grande diferença dos restantes vinhos, tendo o vinho da casta Pinot Noir apresentado o menor valor (313 mg/L). Segundo TRIGO (2008), a casta Touriga Nacional apresenta valores compreendidos entre 293-762 mg/L e a casta Touriga Franca entre 366-565 mg/L, valores inferiores aos obtidos neste trabalho. Contudo, estas diferenças podem estar relacionadas quer com as condições edafoclimáticas quer com a tecnologia de vinificação.

Quadro 3- Antocianinas totais, intensidade e tonalidade corante dos cinco vinhos monovarietais.

Vinhos*	Intensidade Corante	Tonalidade Corante	Antocianinas totais (mg/L)
Touriga Nacional	17,10±0,11 ^c	0,57±0,00 ^a	804±32 ^c
Touriga Franca	13,57±0,03 ^b	0,58±0,00 ^a	705±6 ^b
Sousão	35,17±0,11 ^e	0,52±0,00 ^a	1205±25 ^e
Cabernet Sauvignon	199,0±0,03 ^d	0,52±0,01 ^a	973±9 ^d
Pinot Noir	6,52±0,26 ^a	0,76±0,04 ^b	313±4 ^a

* Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância)

3.5 Seleção e treino do painel de provadores

3.5.1 Testes de ordenação de sabores elementares e treino olfativo

Com o objetivo de treinar o painel e de determinar o limiar de percepção dos provadores em relação aos sabores elementares ácido e doce e sensação tátil de adstringência, realizou-se um teste de ordenação cujos resultados estão apresentados na Figura 1. Como podemos observar, para o sabor ácido (Figura 1, A), todos os provadores acertaram na ordem correta, apenas um acertou em metade da ordenação. Na Figura 1, B verificamos que a maior parte dos provadores acertou corretamente na ordem para a sensação de adstringência, no entanto, dois provadores só conseguiram acertar em metade (50%) e um provador apenas acertou numa resposta correta (25%). Pela observação da Figura 1, C, apenas três provadores não acertaram corretamente no teste de ordenação (50%), enquanto os restantes tiveram a pontuação máxima.

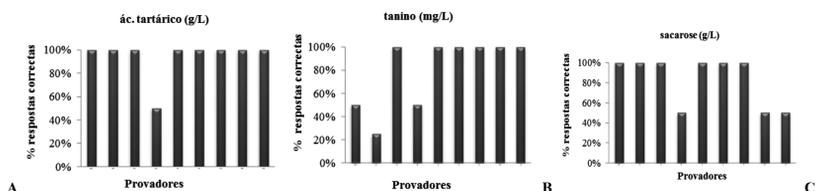


Figura 1 – Percentagem de respostas certas, por provador, no teste de ordenação para o sabor ácido com soluções de concentração crescente de ácido tartárico (A), para a sensação tátil de adstringência, com soluções de concentração crescente de tanino (B) e para o sabor doce com soluções de concentração crescente de sacarose (C).

Para treino da acuidade olfativa foram elaboradas várias soluções de aromas naturais em solução hidroalcoólica a 12% (v/v). A partir do Quadro 4, observamos que os aromas a manteiga, a passas de uva, a bergamota e a amêndoa foram classificados como “*pouco intensos*”, enquanto os aromas a caramelo, a noz e o mel, foram classificados como “*muito pouco intensos*” para os provadores.

Quadro 4 – Percepção/sensação de aromas presentes nos vinhos

N.º Frasco	Descritor	Sensação/percepção e intensidade
1	Esteva/vegetal/floral	Azeite, Verde, Óleo vegetal, <i>Intenso</i>
2	Manteiga	Manteiga, <i>Pouco intenso</i>
3	Citrino/laranja	Tangerina, <i>Intenso</i>
4	Passas de uva	Álcool/doce, <i>Pouco intenso</i>
5	Herbáceo/vegetal	Azeite verde, Erva acabada de cortar, <i>Intenso</i>
6	Compota	Tomate, <i>Intenso</i>
7	Mentol/anis	Eucalipto, Vicky, <i>Intenso</i>
8	Caramelo	Caramelo, <i>Muito pouco intenso</i>
9	Maçã	Maçã, <i>Intenso</i>
10	Noz	Álcool, <i>Muito pouco intenso</i>
11	Eucalipto	Eucalipto, <i>Intenso</i>
12	Maracujá	Maracujá, <i>Intenso</i>
13	Bergamota/citrino	Bergamota, <i>Pouco intenso</i>
14	Pimenta	Pimenta, Especiarias, <i>Intenso</i>
15	Banana	Banana, <i>Intenso</i>
16	Mel	Mel, <i>Muito pouco intenso</i> ,
17	Frutos vermelhos	Frutos vermelhos, Groselha, <i>Intenso</i>
18	Madeira	Madeira, Queimado, <i>Intenso</i>
19	Amêndoa	Amêndoa, <i>Pouco intenso</i>
20	Oxidado	Oxidado, Álcool (cachaça), <i>Intenso</i>

3.7 Perfil sensorial dos vinhos

O perfil sensorial de cada um dos vinhos é mostrado na Figura 2 em que a média dos valores atribuídos pelos provadores a cada atributo 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.

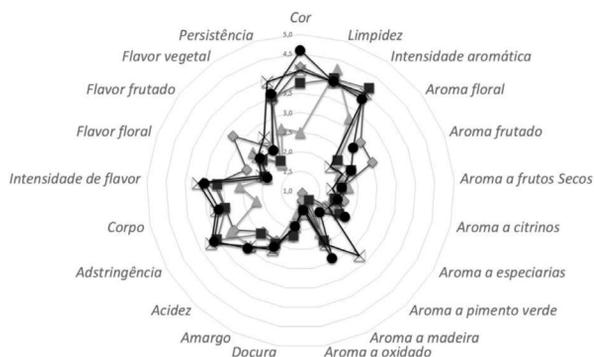


Figura 2 - Perfil sensorial dos vinhos monovarietais das castas Touriga Nacional, Pinot Noir, Touriga Franca, Sousão e Cabernet Sauvignon.

Pela análise da Figura 2 verificamos que o vinho da casta Sousão se destaca pelos descritores *Aroma a madeira* e *Cor*, o vinho da casta Cabernet Sauvignon, pelo descritor *Aroma a pimento verde*. O vinho da casta Touriga Nacional destaca-se pelos descritores orthonasais e retro-nasais relacionadas com *Frutado* e *Floral*.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos após Análise de *Clusters* (distância euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair-group average*) dos dados sensoriais dos diferentes vinhos. No dendograma (Figura 3, A), é possível observar a formação de três grupos, identificados a seguir: grupo 1, formado pelo vinho Pinot Noir; grupo 2, formado, também, por apenas um vinho: Cabernet Sauvignon. E o grupo 3, formado por três vinhos: Sousão, Touriga Franca e Touriga Nacional.

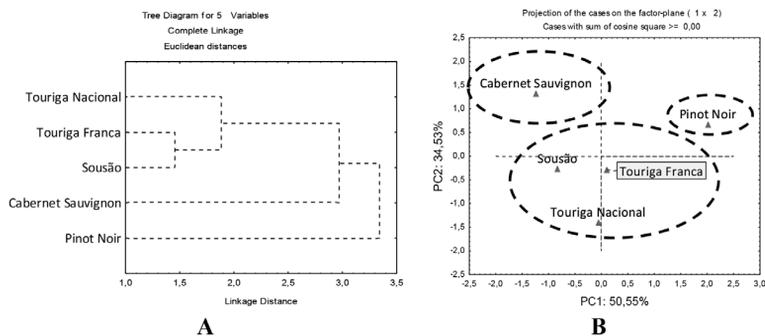


Figura 3 – (A) Dendograma (análise de *clusters*) dos diferentes vinhos monovarietais das castas estudadas. (B) Projeção da *cov-ACP* dos vinhos monovarietais de diferentes castas (Touriga Nacional, Pinot Noir, Touriga Franca, Sousão e Cabernet Sauvignon), avaliadas sensorialmente.

Avaliando a projeção da Figura 3 B, é possível visualizar a distribuição espacial das amostras avaliadas sensorialmente. Dentre os atributos sensoriais analisados, o caráter “*Aroma a pimento verde*” foi quem mais contribuiu para a formação do grupo, com apenas um elemento, onde se encontra o vinho da casta Cabernet Sauvignon. A casta Sousão caracteriza-se pelo descritor “*Cor*”, com um elevado peso na Componente Principal 1.

4 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos na Análise de *Clusters* e Análise em Componentes Principais, é possível observar a formação de três grupos que distinguem os vinhos Pinot Noir e Cabernet Sauvignon dos restantes vinhos que, sensorialmente parecem agrupar-se (Sousão, Touriga Franca e Touriga Nacional). Para a formação destes grupos contribuíram os descritores “*Aroma a pimento verde*”, característico do Cabernet Sauvignon, e os descritores orthonasais e retro-nasais relacionadas com “*Fruitado*” e “*Floral*” da Touriga Nacional. O vinho da casta Touriga Franca é caracterizado pela sua “*Intensidade aromática*” enquanto, o vinho da casta Sousão se distingue por apresentar uma cor mais intensa. Da relação da análise sensorial e da análise físico-química, conclui-se que o vinho da casta Sousão apresenta uma cor mais intensa do que os restantes vinhos, enquanto o vinho da casta Pinot Noir apresenta a cor menos intensa.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer às Professoras Doutoras Ana Barros e Paula Lopes pelo fornecimento das amostras de vinho. A todo o painel de provedores da ECVA-DeBA/UTAD (Ana Abraão, Ana Santos, António Lage, António Bacelar, António Inês, Berta Gonçalves, Eunice Bacelar, Paula Ribeiro, Rosário Anjos e Teresa Pinto) agradecemos o empenho e dedicação na realização das provas sensoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÓNIMO (2013). Retirado de: <http://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=81&codSeccao=2&i-dio=0>. Acedido a 4 de Maio de 2013.
- GUERRA J. (2009). Caracterização Enológica de Castas Autóctones. Região Demarcada do Douro. *Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro*. 1-16.
- GUERRA J.; ABADE E. (2008a). Caracterização Enológica de Castas Autóctones da Região do DOURO. *Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro*. 1-12.
- GUERRA J.; ABADE E. (2008b). Castas do Douro - Caracterização Enológica das Castas Tintas. *Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro*. 1-12.
- ISO 3591 (1977) Sensory analysis -Apparatus - Wine-tasting glass. International Organization for Standardization: Geneva.
- ISO 4121 (2003) Sensory analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales. International Organization for Standardization: Geneva.
- ISO 8589 (2007) Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization: Geneva.

- KRAMLING T.E.; SINGLETON V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
- OIV (2013). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et moûts. Ed. Officielle. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., STRONESTREET E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin Société de Chimie*, 9, 2649-2652.
- RIBÉREAU-GAYON P.; PEYNAUD E.; SUDRAUD P. (1982). Science et Techniques du vin. Tome 4. Dunod: Paris. STAT SOFT INC (2010) Electronic Statistics. Tulsa, USA.
- TEIXEIRA E.D. (2003). Contributo para a caracterização cromática da casta Vinhão em parcelas da zona de intervenção da Adega Cooperativa de Ponte de Lima. Relatório de Estágio em Enologia. UTAD.
- TRIGO M.S.A.S. (2008). Avaliação da diferenciação de monocastas a partir de bagos de diferentes castas. Perfil de antocianinas. Relatório de Estágio em Enologia. UTAD.

COMPARISON OF FRX AND ICP-M TECHNIQUES IN THE EVOLUTION OF MINERAL ELEMENTS CONTENT IN WINEGRAPE BERRY (*VITIS VINIFERA* L. CV. CENCIBEL) IN LA MANCHA (SPAIN).

José Ángel AMORÓS^{1,2*}, Sandra BRAVO^{1,2}, Caridad PÉREZ-DE-LOS-REYES^{1,2}, Francisco Jesús GARCÍA-NAVARRO^{1,2}, Jacinto ALONSO-AZCÁRATE³, Pablo HIGUERAS², Mónica SÁNCHEZ-ORMEÑO¹, Irene GARCIA-CALVO¹ and Vanesa ZAMORA¹

ABSTRACT

The study of the evolution of the mineral content of grapeberry cv. Cencibel (the most important red variety cultivated in Castilla-La Mancha) can be very interesting for fertilization, harvest monitoring and origin traceability. The plot under investigation is located in Carrión de Calatrava (Ciudad Real, Spain). In 2013, ten cluster of grapes, one by plant, were collected and 20 berries were taken from each grape. Sampling process was carried out in two different times, before veraison (13th July) and before harvest (13th sept.). Grape and leaf mineral content is reported using X-ray fluorescence and ICP-M technique.

The obtained results showed that all major elements substantially decreased in all cases. The element that showed higher concentrations at harvest was K with $1.29 \pm 0.28 \text{ g/kg}^{-1}$. Most of trace element shows a depletion since the veraison until the ripeness. FRX technique shows better performance for trace elements than ICP-M in the conditions of the study.

KEYWORDS – Mineral elements / FRX / ICP-M / Grapevine

1. INTRODUCCIÓN

From the nutritional point of view, there are 14 mineral elements which are considered to be essential for the growth and development of plant (Baker and Pilbeam, 2007), with some having a role in the structure of organic compounds while others are involved in enzyme activation, or as a charge carrier and osmoregulator (Marschner, 2012).

¹ Universidad de Castilla-La Mancha. Escuela de Ingenieros Agrónomos de Ciudad Real. Ronda de Calatrava 7, 13071 Ciudad Real, Spain.

² Universidad de Castilla-La Mancha. Instituto de Geología Aplicada. Plaza Manuel Meca 1, 13400 Almadén (Ciudad Real), Spain.

³ Universidad de Castilla-La Mancha. Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica de Toledo. Avenida de Carlos III s/n, 45071 Toledo, Spain.

There are very few world references about the concentration of trace element in grape and vine leaf. However, many references about wine-soil relationship through elemental analysis are published.

Thus, the following questions should be answered: Do all the elements have the same behavior along the season? Is the date of the sample key to identify the physiological state or geochemical fingerprint? Are there any relationship between major and trace elements in the plant uptake behavior? Is the technique of measure determinant for the result?

2. MATERIALS AND METHODS

The plot under investigation is located in Carrión de Calatrava (Ciudad Real, Spain), with the following geographical coordinates: 39°01'50.51'' (N) – 03°48'34.39'' (W).

In 2013, 10 cluster of grape (cv. Cencibel), one grape by plant, were collected and 20 berries were taken from each grape. Sampling process was carried out in two different times, before veraison (13th July) and before harvest (13th September). The berries samples were frizzed and dried in an oven for 10 days.

The mineral element content was determined by two techniques: X-ray fluorescence (Philips PW 2404 spectrometer with a maximum power of 4kW) and ICP-M (Thermo Electron X Series II. Rhodium). The samples for X-ray fluorescence were ground in an agatar mortar. In order to determine the total concentration of the elements for ICP 0.5 g of sample was digested with a mixture of acids (9 mL of concentrated HNO₃ + 3 mL of concentrated HCl) in a microwave unit, CEM MARS 5, Matthews, USA, according to the EPA 3051A method. The samples were analyzed by using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS).

3. RESULTS

The values of concentration for the studied element in grape berry are reported in Table 1.

Table 1. Element concentration in grape berry in 2013 (FRX method).

	Ca	Si	K	Mg	P	S	Al	Fe	Sr	Ba	Zn	Ce	Cs	La	Rb	Nb
July	0.48	0.35	2.68	0.26	0.31	0.35	140.00	20.00	48.60	10.00	11.40	9.70	5.60	4.32	5.80	4.10
September	0.07	0.06	1.29	0.06	0.08	0.09	20.00	10.00	24.10	9.00	7.4	4.5	3.9	6.5	3.6	4.10

For essential nutrients the result showed that all element substantially decreased (Figure 1) along the season. The element that showed more concentration at harvest was potassium (K) and the element that showed less concentration at harvest was magnesium (Mg) and silicon (Si). Most of trace elements showed a depletion from veraison to ripeness. The element, of these group, that showed more concentration at harvest was aluminum (Al) with $140.0 \pm 18.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Lanthanum (La) behavior was different, showing higher concentration in September than in July ($6.5 \text{ vs. } 4.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

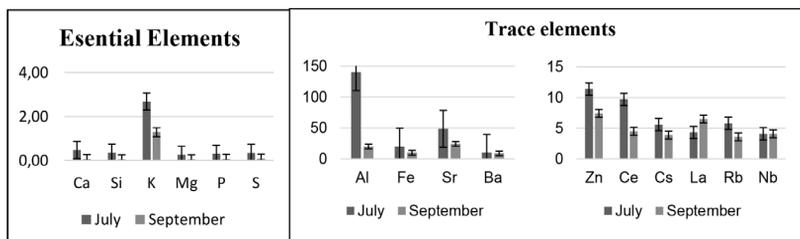


Figure 1: Variation of essential and trace elements content in vine berry in 2013 (FRX method).

Figure 2 represents seasonal variation of mineral content in vine leaves in line graphic (Amoros *et al.*, 2014). In X-axis the 6 month when samples were taken is represented. Y-axis represents the concentration of each element ranging for the higher concentration, on the left, to lesser concentration, on the right.

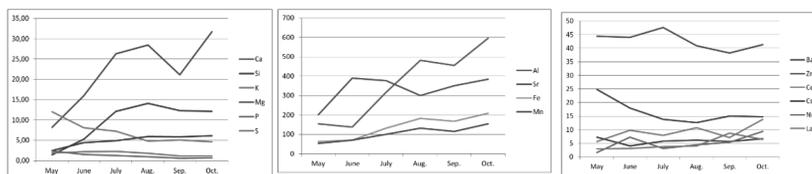


Figure 2: Monthly variation of mineral content in vine leaf along 2013 season (Concentration in Ca to S are given in $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and in $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for the other elements; FRX Method).

Figure 3 shows the lower concentrations of amount detected by ICP-M method in comparison with FRX method for some elements. It can be seen that the ICP-M method is less precise for trace elements determination in the conditions of this study.

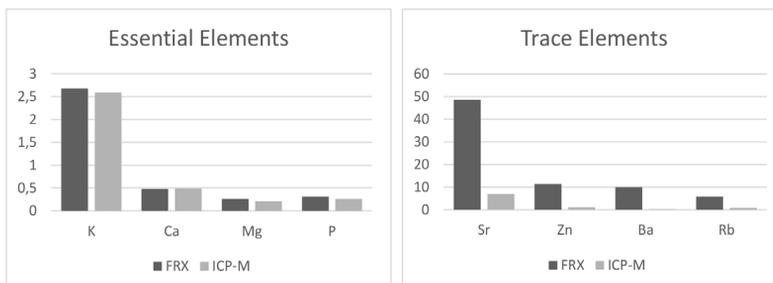


Figure 3: Concentrations obtained by both (FRX and ICP-M) methods.

The results are consistent with previous studies that reported that the majority of trace elements that appear in harvest are linked to permanent structures. The behavior of these elements is similar to Ca that is bound to cell walls (pectines).

4. CONCLUSION

Not all chemical elements showed the same behavior along the season in vine leaf and berry composition.

FRX Method shows better accuracy for the trace elements detection in berry than ICP-Ms under the conditions of this study.

5. ACKNOWLEDGMENT

This work has been done with the support of “Ayuda a grupos de apoyo del plan propio” University of Castilla-La Mancha.

6. REFERENCES

- Amorós, J.A., Pérez-de-los-Reyes, C.; García, F.J.; Bravo, S.; Sánchez-Ormeño, M.; Higuera, P.L. (2014): Seasonal uptake of mineral elements in grapevine leaf (*Vitis vinifera* L. cv. Cencibel) cultivated in La Mancha (Spain). Proceeding of Xth International Terroir Congress. Tokay (Hungary).
- Baker, A.L.; Pilbeam, D.J. (2007): Handbook of plant nutrition. CRC Press. Boca Raton. USA.
- Marschner, P. (2012): Nutrition of higher plants. 3th edition. Ed. Elsevier.

CONTRIBUIÇÃO DA VARIEDADE E DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA PARA O PERFIL EM COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR DE VINHOS VARIETAIS ALENTEJANOS

Raquel GARCIA¹; Fernando Rei²; Maria João CABRITA²

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo identificar a influência da variedade e o impacto da fermentação maloláctica, no perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular de vinhos varietais do Alentejo.

Para o efeito, foram doseados alguns compostos fenólicos (aldeído protocatéquico e ácidos gálico, protocatéquico, caftárico, vanílico, fertárico, siringico, cafeico, p-coumárico, ferílico e coutárico) em 81 vinhos varietais produzidos na Adega Experimental da Universidade de Évora, 48 da casta Trincadeira, e os restantes das castas Aragonez, Cabernet Sauvignon, Alfrocheiro, Castelão e Touriga Nacional.

A análise dos dados obtidos, através do método da partição de variância, permitiu identificar a variedade como a variável que mais influência teve no perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular dos vinhos varietais.

Palavras-Chave: vinhos varietais, fermentação maloláctica, compostos fenólicos de baixa massa molecular

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos, metabolitos secundários que se caracterizam por terem um ou mais grupos fenol na sua estrutura, têm grande importância nos vinhos dada a sua contribuição para a cor, sabor e adstringência. Embora presentes em pequenas quantidades, os compostos fenólicos de baixa massa molecular, compostos não-flavonoides, apresentam também um papel importante nas características dos vinhos. Os principais ácidos fenólicos existentes nos vinhos são ácidos hidroxibenzóicos (estrutura em C6-C1) e hidroxicinâmicos (estrutura em C6-C3). Estes últimos existem

¹ IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal. raquelg@uevora.pt

² Escola de Ciências e Tecnologia Departamento de Fitotecnia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal. frei@uevora.pt; mjbc@uevora.pt

também na forma de ésteres tartáricos, nomeadamente os ácidos tartárico, coumárico e cafetárico, que prevalecem nos vinhos antes da fermentação maloláctica (FML), sendo as suas formas livres, ácidos ferúlico, *p*-coumárico e cafeico, predominantes em vinhos que sofreram a FML (Cabrita et al. 2008).

A tecnologia, nomeadamente a FML, e a variedade de uva são dois factores fundamentais que afectam o teor em compostos fenólicos dos vinhos. Diferentes abordagens estatísticas têm sido utilizadas para avaliar o efeito destes factores no perfil fenólico dos vinhos. No presente trabalho, optou-se por uma abordagem estatística não usual, a partição de variância, que representa uma opção estatística mais eficiente que uma simples análise em componentes principais.

O método da partição de variância (PV) é um procedimento estatístico que pretende quantificar os efeitos de um conjunto de variáveis explanatórias, que são genericamente variáveis ambientais quando esta análise é utilizada em estudos de Ecologia e ajudam à interpretação de um determinado fenómeno biológico (Borcard et al. 1992, Borcard and Legendre 1994, Liu 1997, Cushman and McGarigal 2002, Vandvik and Birks 2002). O objectivo desta análise é perceber a variabilidade associada às variáveis em estudo e quantificar a contribuição de cada variável explanatória para esta variabilidade num determinado fenómeno biológico (variável de resposta). Em relação a outros métodos não paramétricos, como a análise em componentes principais (PCA), a PV permite recolher muito mais informação sobre os dados originais, nomeadamente a contribuição de cada variável explanatória para a variabilidade associada a um grupo de variáveis de resposta.

Esta abordagem estatística permitiu concluir que a variedade tem, de facto, um papel mais importante do que a FML, no perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular em vinhos tintos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Os vinhos

Neste trabalho foram utilizados vinhos varietais produzidos na Adega experimental da Herdade da Mitra, Universidade de Évora, tendo sido estudados dois grupos: 36 vinhos das castas Trincadeira, Aragonez, Cabernet Sauvignon, Alfrocheiro, Castelão e Touriga Nacional, de 3 anos consecutivos, e 45 vinhos da casta Trincadeira, dos quais 15 realizaram a FML espontaneamente e 30 com adição de bactérias lácticas *Biolact Acclimatée* e *Biolact Acclimatée 4R* da AEB (Brescia, Italy). Em todos os vinhos foram colhidas amostras antes e depois da FML.

2.2. Determinação dos compostos fenólicos de baixo peso molecular

Realizou-se uma extracção líquido-líquido de acordo com o protocolo proposto por Malavaná et al (2001): a 5 mL de vinho com o pH ajustado a 2, adicionaram-se duas vezes 5 mL de éter dietílico, com agitação durante 10 minutos. O extracto orgânico obtido foi evaporado sob corrente de azoto, e o resíduo foi resuspenso em 1 mL de metanol-água (1:1, v/v) e filtrado para posterior análise por HPLC.

Uma alíquota de 20 μ L de cada extracto foi injectada numa coluna Superpher® 100, C18 (5 μ m tamanho de partícula, 250 mm x 4.6 mm diâmetro interno) (Merck, Darmstadt, Germany) e analisados de acordo com o método cromatográfico descrito em Cabrita *et al* (2008): solvente A (água : ácido acético, 98:2, v/v), solvente B (água : metanol : ácido acético, 68:30:2, v/v/v) com o seguinte programa de gradiente para o solvente A: de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocrático durante 9 min; de 23% a 0% (8 min); isocrático durante 5 min.

A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV-Vis dos compostos com padrões. Os comprimentos de onda usados foram 280, 254 and 320 nm e foram registados os espectros de cada pico entre 190 e 40nm. 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. Os ácidos caftárico, coutárico e fertárico foram isolados a partir de vinho de acordo com Singleton et al. (1978) e os espectros foram usados para identificação. A quantificação destes compostos foi expressa em ácido cafeico, *p*-coumárico e ferulico.

2.3. Tratamento dos dados

O método da partição de variância foi realizado com recurso ao programa estatístico Canoco para Windows v. 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA), de acordo com o procedimento descrito por Lepš and Šmilauer (2003). A variabilidade total associada aos vinhos das diferentes variedades foi decomposta em duas variáveis explanatórias, a variedade e a FML, pela realização de análises de redundância (RDA) parciais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método da partição de variância (Figura 1), permitiu decompor a variabilidade existente entre as amostras em estudo considerando os seguintes efeitos: o efeito apenas atribuído à variedade (A); o efeito apenas atribuído à fermentação maloláctica (B), o efeito combinado destes dois factores (C), e ainda, uma parte da variabilidade que não é explicada por estes factores (D).

Utilizando a variedade e a fermentação maloláctica como variáveis explanatórias, foi possível explicar 70.4% da variabilidade total das amostras com base nestes dois factores. Por sua vez, a análise dos dados, considerando-se a variedade como variável explanatória e a FML como co-variável, permitiu explicar 63.3% da variabilidade total. Quando a FML foi considerada como variável explanatória e a variedade como co-variável, verificou-se que apenas 4.0% da variabilidade total foi explicada pela variável FML. Foi ainda observado que 2,8% de variabilidade resulta da interacção das duas variáveis, não sendo possível atribuí-la a nenhuma delas. Os resultados desta análise permitem afirmar que a variedade tem de facto, um efeito mais pronunciado do que a fermentação maloláctica, no perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular de vinhos varietais.

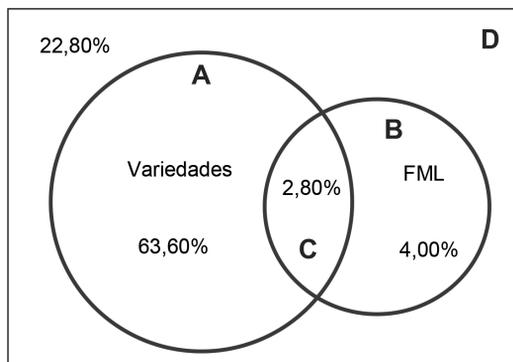


Figura 1 – A composição do vinho em compostos fenólicos de baixa massa molecular explicada pelas variáveis explanatórias variedade e FML através da partição de variância

Na figura 2 apresentam-se exemplos de perfis dos vinhos depois da fermentação maloláctica das várias castas em estudo. A sua observação mostra que os perfis apresentam-se diferentes consoante a casta de origem. O efeito do ano (dados que não se apresentam) verifica-se mais em termos quantitativos do que qualitativos, significando que o perfil de cada vinho se mantém mais ou menos semelhante de ano para ano.

Na figura 3 apresenta-se um efeito da FML sobre o perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular no vinho da casta Touriga Nacional. Por acção do metabolismo das bactérias lácticas que ocorre com o decurso da FML, espontânea ou não, verificou-se que os teores em ácido gálico, ácido siríngico, ácido protocatéquico e ácido vanílico têm tendência a aumentar, enquanto que os teores de ácido caftárico, coutárico e fertárico têm tendência a diminuir, e nos casos em que isto acontece verifica-se um aumento de ácido cafeíco, *p*-cumárico e ferulico. Já em trabalhos anteriores havíamos referido o efeito da FML na libertação dos ácidos cafeico, ferúlico e *p*-coumárico a partir dos respectivos ácidos hidroxicinâmicos (Cabrita et al, 2008).

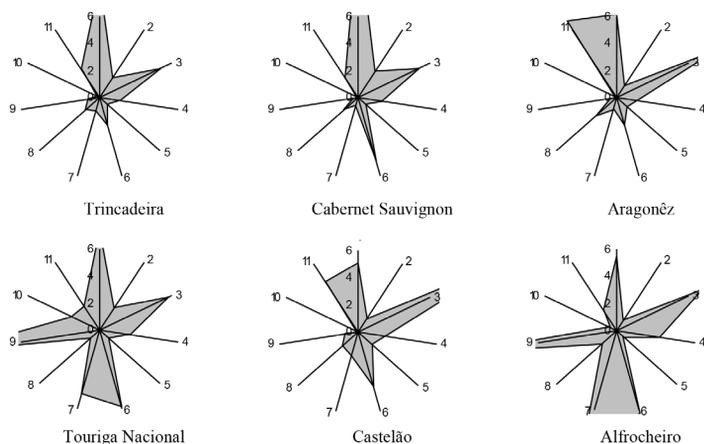


Figura 2 – O efeito da variedade nos compostos fenólicos de baixa massa molecular
Legenda: 1 – ácido gálico, 2 – ácido protocatéuico, 3 – ácido caftárico, 4 – ácido vanílico, 5 – ácido fertárico, 6 – ácido siringico, 7 – ácido cafeico, 8 - aldeído protocatéuico, 9 – ácido p-coumárico, 10 – ácido ferúlico, 11 – ácido coutárico.



Figura 3 – O efeito da FML nos compostos fenólicos de baixa massa molecular

4. CONCLUSÕES

Apesar do impacto da FML sobre as características dos vinhos, nomeadamente sobre o seu perfil em compostos fenólicos de baixa massa molecular, a variedade tem de facto um elevado efeito sobre as características finais dos vinhos.

O conhecimento das características químicas de cada casta, quer respeitante aos compostos fenólicos, quer respeitante a outros compostos importantes como por exemplo os compostos voláteis varietais, reveste-se assim de grande importância, por poder ser encarado pelos enólogos como mais uma ferramenta para retirar de cada casta todo o seu potencial enológico e adaptar as tecnologias às características da matéria-prima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borcard, D. and Legendre, P. (1994) Environmental control and spatial structure in ecological communities: an example using oribatid mites (Acari, Oribatei). *Environmental and Ecological Statistics* 1, 37–61.
- Borcard, D., Legendre, P. and Drapeau, P. (1992) Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73, 1045–1055.
- Cabrita, M.J., Torres, M., Palma, V., Alves, E., Patão, R. and Costa Freitas, A.M. (2008) Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta* 74, 1281–1286.
- Cushman, S.A. and McGarigal, K. (2002) Hierarchical, multiscale decomposition of species-environment relationships. *Landscape Ecology* 17, 637–646.
- Lepš, J. and Šmilauer, P. (2003) Multivariate analysis of ecological data using CANOCO (Cambridge University Press, Cambridge, UK).
- Liu, Q. (1997) Variation partitioning by partial redundancy analysis (RDA). *Environmetrics* 8, 75–85.
- Malovaná, S., Montelongo, F.J.G., Pérez, J.P. and Rodrigues-Delgado, M.A. (2001) Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 428, 245–253.
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F. and Lea, A.G.H. (1978) The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 403–410.
- Vandvik, V. and Birks, H.J.B. (2002) Partitioning floristic variation in Norwegian upland grassland into within-site and between-site components: are the patterns determined by environment or by land use? *Plant Ecology* 162, 233–245.

EFEITO DA ADIÇÃO DE GOMA-ARÁBICA E DE CARBOXIMETILCELULOSE NA ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA E CARACTERÍSTICAS DO VINHO BRANCO MONOVARIETAL DA CASTA AVESSO

Cristina MARINHO⁽¹⁾, Luís FILIPE-RIBEIRO⁽¹⁾, Raquel GUISE⁽¹⁾, Marlene PINTO⁽¹⁾, Fernando M. NUNES⁽²⁾, Fernanda COSME^{(3)*}

RESUMO

A instabilidade tartárica do vinho é um problema para os produtores de vinhos em todo mundo vitivinícola, sendo a sua estabilização uma prática vulgar em enologia. Assim, este trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito da goma-arábica e da carboximetilcelulose (CMC) na estabilização tartárica e em algumas características do vinho branco monovarietal da casta Avesso. Para atingir os objetivos propostos, foi avaliada a estabilidade tartárica, a composição fenólica e a cor dos vinhos após aplicação dos produtos enológicos selecionados. Foram utilizadas duas carboximetilceluloses e duas gomas arábicas do tipo Seyal, devidamente caracterizadas. Os resultados obtidos mostram que a goma-arábica e a carboximetilcelulose podem ser usadas na estabilização tartárica do vinho branco, contudo a diminuição da condutividade da goma-arábica é inferior à obtida pelo CMC. No vinho branco não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides e na cor após aplicação da goma-arábica e da CMC. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser bastante úteis para a indústria vitivinícola, uma vez que mostram também a eficiência da goma-arábica ao nível da estabilização tartárica do vinho branco.

Palavras-chave: Estabilização tartárica, goma-arábica, carboximetilcelulose, compostos fenólicos, cor.

⁽¹⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁽²⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁽³⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Biologia e Ambiente - Edifício de Enologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal. * *fcosme@utad.pt*

1. INTRODUÇÃO

A instabilidade tartárica do vinho é um problema de todo os vinhos, sendo a sua estabilização uma prática vulgar em enologia. O vinho encontra-se sobressaturado em bitartarato de potássio (KHT). Um vinho não estabilizado corre o risco de formar depósitos cristalinos de KHT. Esta cristalização é perfeitamente natural, inócua para a saúde mas, se ocorrer na garrafa prejudica a apresentação dos vinhos colocados no comércio (SANTOS *et al.*, 2000).

Usualmente os vinhos são estabilizados pelo frio, este processo provoca modificações na composição dos vinhos, com maior incidência nas características sensoriais. Além de que efectuar a estabilização de um vinho durante longo período de tempo a baixa temperatura, aumenta o risco de oxidação.

Assim, justifica-se que os produtores de vinho procurem processos de estabilização tartárica alternativos, como a aplicação de goma-arábica e de carboximetilcelulose.

A aplicação da goma-arábica está autorizada para uso enológico desde 1972 (Resolução OENO 12/72). A composição química da goma-arábica é complexa e consiste num grupo de macromoléculas caracterizadas por uma elevada proporção de polissacarídeos (~97%), o qual é predominantemente composto por unidades de D-galactose e L- arabinose e por uma pequena proporção de proteínas (< 3%) (ISLAME *et al.*, 1977). A sua composição química pode variar de acordo com a sua origem (*Acacia senegal* ou *Acacia seyal*), a idade das árvores a partir da qual foi obtida, época de colheita, as condições climáticas e do solo (ANDERSON, 1986).

A carboximetilcelulose (CMC) é obtida por reação específica entre a celulose, e o ácido cloro-acético em condições alcalinas (BOWYER *et al.*, 2010). A utilização da CMC foi inicialmente autorizada unicamente para vinhos brancos e espumantes (BOWYER *et al.*, 2010; MOUTOUNET *et al.*, 2010; SALAGOÏTY *et al.*, 2011). Posteriormente o uso de CMC estendeu-se também a vinhos tintos e rosés. O interesse enológico do CMC reside na sua capacidade de melhorar a estabilidade tartárica do vinho, inibindo a nucleação e o crescimento dos cristais de bitartarato de potássio (BOWYER *et al.*, 2010; MOUTOUNET *et al.*, 2010). Por outro lado, a carboximetilcelulose é uma molécula estável em ambiente ácido, a elevada temperatura sendo assim capaz de assegurar a sua estabilidade tartárica ao longo do tempo (GREEF *et al.*, 2012). A dose máxima permitida de carboximetilcelulose é de 10 g/hL (100 mg/L) (Reg. EU-606/2009). A CMC é caracterizada pelo grau de polimerização (comprimento da cadeia) e pelo grau de substituição (número médio de grupos carboxilo por unidade anidro- glucose). Quanto mais elevado for o grau de polimerização, maior será a viscosidade da solução de CMC. No que diz respeito ao grau de substituição, à medida que este aumenta, verifica-se o aumento da solubilidade da solução. O grau de substituição máximo teórico é de 3, sendo que para os produtos comercialmente disponíveis está compreendido entre 0,5 – 1,5 (OIV CODEX ENOLÓGICO, 2013).

Assim, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito de gomas-arábica e de CMC's devidamente caracterizados na estabilização tartárica bem como em algumas características do vinho branco monovarietal da casta Avesso.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinhos

Neste trabalho foi utilizado um vinho branco monovarietal da casta Avesso da Região Demarcada dos Vinhos Verdes, com as seguintes características: Teor alcoólico 10,6 % (v/v); Massa volúmica a 20°C 0,9921 (g/cm³); pH 3,14; Acidez total 7,7 (g ácido tartárico/L); Acidez volátil 0,23 (g ácido acético/L). As análises dos parâmetros convencionais do vinho foram efetuadas de acordo com os métodos oficiais da OIV (OIV, 2012).

2.2 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

Os polissacarídeos, CMC e goma-arábica foram caracterizados antes da sua aplicação. As CMC's foram caracterizadas de acordo com GUISE *et al.* (2014) e as gomas- arábicas foram caracterizadas quanto à sua composição em açúcares de acordo com o método descrito por RIBEIRO *et al.* (2014). Todas as determinações foram efetuadas em duplicado

2.3 Ensaio de estabilidade tartárica do vinho

O ensaio de estabilidade tartárica com aplicação de goma-arábica e carboximetilcelulose foi efectuado em duplicado em provetas de 1 litro. Foi também efectuado um ensaio, em duplicado sem adição de produtos enológicos, que serviu de controlo. A dose aplicada foi de acordo com a ficha técnica do fabricante, tendo-se ensaiado para a carboximetilcelulose duas doses diferentes (50 e 100 mg/L) e para a goma-arábica também duas doses diferentes (1 e 2 mL/L). Ao fim de 6 dias procedeu-se à avaliação da estabilidade tartárica dos vinhos, em duplicado. Tendo em conta o objetivo do trabalho, foram seleccionadas duas carboximetilceluloses (CMCA e CMCB) e duas gomas arábicas do tipo *Seyal* (GSA e GSB).

2.4 Avaliação da estabilidade tartárica

A estabilidade tartárica dos vinhos foi avaliada pelo método do mini-contato. Para tal, foi utilizado um aparelho: Check Stab. Este teste consiste na medição da variação da condutividade do vinho, mantido a uma temperatura de 0 °C sob agitação contínua, antes e após a adição de cristais de bitartrato (BOSSO *et al.*, 2010). O vinho é considerado estável quanto à instabilidade tartárica quando a sua diferença de condutividade é igual ou inferior a 30 µS/cm, e instável quando o valor da diferença de condutividade é superior a 30 µS/cm (BULLIO, 2002). Todas as determinações foram efetuadas em duplicado

2.5 Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

A determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos efectuou-se de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não- flavonóides dos vinhos foram determinados pela absorvância a 280 nm, após a

reação com o formaldeído, de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais foi possível determinar os compostos fenólicos flavonóides. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração elaborada com o ácido gálico. Todas as determinações foram efetuadas em duplicado.

2.6 Determinação da cor

A cor foi determinada pela absorvância a 420 nm (A_{420} nm) numa cuvette de 1 cm de percurso ótico (OIV, 2012). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados das análises físico-químicas foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) utilizando o software de Statistica versão 10 (Statsoft, OK, EUA). O teste de Tuckey a 5% de significância foi aplicado para efectuar a comparação entre as médias dos vinhos submetidos a diferentes tratamentos, recorrendo ao mesmo software.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos polissacarídeos

A caracterização das duas gomas-arábicas quanto à sua composição em açúcares está apresentada na tabela 1. Os resultados indicam, como esperado, que o açúcar que está em maior concentração é a galactose seguido da arabinose. A goma GSB é a que apresenta maior concentração em fucose. Ambas as gomas (GSA e GSB) apresentam elevada concentração de arabinose.

As características físico-químicas dos CMC's caracterizados estão apresentadas na tabela 2. Os CMC's estudados apresentaram diferentes graus de substituição, que são de 0,74 (CMC B) e de 1,12 (CMC A) e, diferentes pesos moleculares, de 344 KDa (CMC B) e de 441 KDa (CMC A).

Tabela 1. Composição em açúcares das gomas-arábicas por análise cromatografia (média \pm desvio padrão).

Composição em açúcares da goma-arábica (g/100g)

	Fucose	Ramnose	Arabinose	Galactose	Ác. Galacturónico	Ác. Glucorónico	Açúcares Totais
GSA	0,39 \pm 0,01	2,08 \pm 0,04	28,62 \pm 2,48	46,72 \pm 2,62	2,12 \pm 0,23	0,58 \pm 0,03	80,51
GSB	1,26 \pm 1,38	1,66 \pm 0,09	22,15 \pm 5,87	46,39 \pm 0,90	1,12 \pm 0,45	1,50 \pm 1,71	74,08

A composição em sódio (presente como contra-íon dos grupos ácido carboxílico) das carboximetilceluloses estudadas foi de 7,06 (CMC B) e de 7,68g/100g (CMC A). A CMC B apresentou a concentrações de potássio mais elevada (3,15g/100g).

Tabela 2. Características físico-químicas das carboximetilceluloses (adaptado de Guise et al. 2014).

CMC	Viscosidade η_{sp}/c (mPas) em solução a 0,1%	Grau de substituição (DS)	Peso molecular médioKda	Potássio g/100g	Sódio g/100g	Cálcio g/100g	Magnésio g/100g
CMC A	1,15±0,04	1,12±0,05	441±7	0,044±0,001	7,68±0,02	0,055±0,002	0,008±0,001
CMC B	1,03±0,02	0,74±0,01	344±23	3,15±0,04	7,06±0,02	0,083±0,005	0,12±0,01

3.2 Efeito da aplicação de diferentes gomas-arábica e de carboximetilceluloses na estabilidade tartárica do Vinho Verde branco monovarietal da casta Avesso

Pela análise dos resultados obtidos para o vinho branco (Figura 1), verificou-se que a aplicação de CMC baixa a condutividade do vinho de forma significativa, sendo essa queda mais significativa quando a dose aplicada é superior. A aplicação das gomas-arábicas GSA e GSB, apresentaram alguma capacidade estabilizante do vinho, uma vez que, baixaram a condutividade do vinho relativamente à testemunha, muito embora, o CMC tenha sido mais eficaz. Tal como no CMC, regra geral, também na aplicação das gomas se verificou que a dose mais elevada foi mais eficaz. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por BOSSO *et al.* (2012) e por GUISE *et al.* (2014) relativamente à aplicação de CMC e goma-arábica em vinhos brancos.

Um vinho é considerado estável quanto à instabilidade tartárica, se a sua diferença de condutividade for $\leq 30 \mu\text{S}/\text{cm}$.

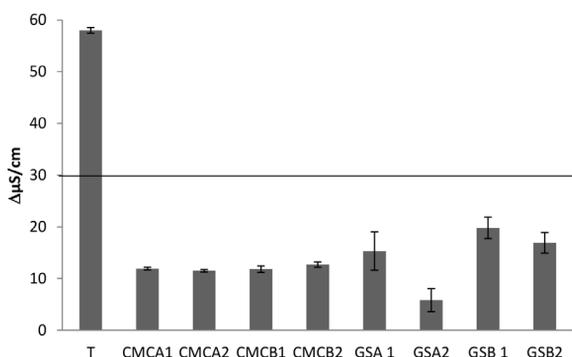


Figura 1. Estabilidade tartárica do vinho branco após aplicação dos CMC (CMCA e CMCB) e das goma-arabica (GSA e GSB), na dose 1 (dose mais baixa) e na dose 2 (dose mais elevada).

3.2 Efeito da aplicação da goma-arábica e da carboximetilcelulose nos compostos fenólicos totais, não-flavonóides, flavonóides e cor do Vinho Verde branco monovarietal da casta Avesso

Após a aplicação da CMC e das gomas-arábicas, o teor em compostos fenólicos não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) quer para os compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides (Figura 2).

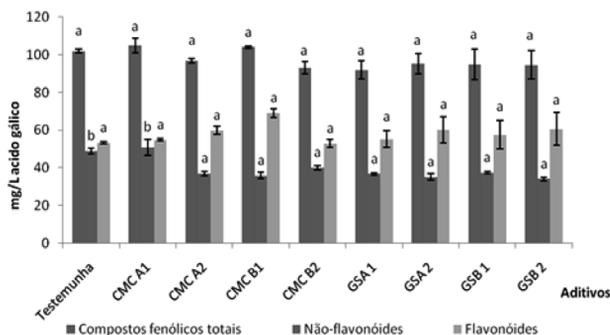


Figura 2. Compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides do vinho após aplicação dos CMC (CMCA e CMCB) e das gomas-arábicas (GSA e GSB), na dose 1 (dose mais baixa) e na dose 2 (dose mais elevada) * Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

Os compostos fenólicos, têm um papel muito importante, porque são responsáveis pela cor, adstringência e corpo dos vinhos. Dado não haver diferenças significativas no teor de compostos fenólicos também não se verificaram diferenças significativas na cor do vinho, apesar de haver uma ligeira diminuição dos valores em relação à testemunha.

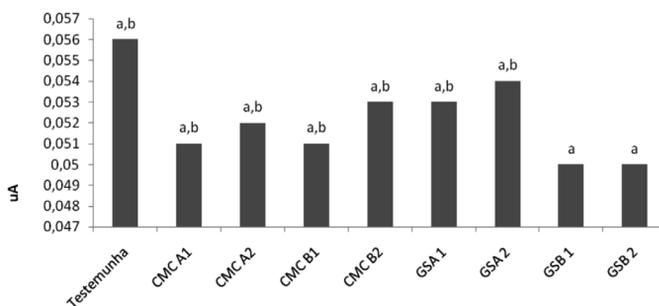


Figura 3. Cor do vinho branco após aplicação dos CMC (CMCA e CMCB) e das gomas-arábicas (GSA e GSB), na dose 1 (dose mais baixa) e na dose 2 (dose mais elevada). * Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que a goma-arábica *Seyal* e a carboximetilcelulose podem ser usadas na estabilização tartárica do vinho branco, contudo a CMC reduz mais a condutividade comparativamente à goma-arábica. Não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de compostos fenólicos totais, não-flavonóides, flavonóides e na cor do vinho após aplicação quer do CMC quer da goma-arábica, independentemente das características estruturais e da concentração testada. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser bastante úteis para a indústria vitivinícola, uma vez que mostram também a eficiência da goma-arábica ao nível da estabilização tartárica do vinho branco.

AGRADECIMENTOS

À Quinta da Lixa, pela disponibilização de vinhos, equipamentos e análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SANTOS P.C., PEREIRA O.M., GONÇALVES F., SIMÕES J.T., PINHO M.N. (2000). Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: estudo comparativo da eletrodiálise e de um método tradicional, *Ciência Téc. Vitiv.*, 15: 95-108.
- ANDERSON D.M. (1986). Evidence for the safety of G.A. (*Acacia senegal* (L.) Willd.) as a food additive – a brief review. *Food Addit. Contam.*, 3: 225-230.
- BOWYER P., GOUTY C., MOINE V., MARCH R., BATTAGLENE T. (2010). CMC: A new potassium bitartrate stabilisation tool. *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.*, 558, 65-68.
- MOUTOUNET M., BOUISSOU D., ESCUDIER J.L. (2010). Efeitos do tratamento de estabilização tartárica dos vinhos tintos através de uma goma de celulose (carboximetilcelulose). Disponível em www.infowine.com.
- SALAGOÏTY M. H., GUYON F., RENE L., GAILLARD L., LAGREZE C., DOMEQ A., BAUDOUIN M., MEDINA, B. (2011). Quantification method and organoleptic impact of added carboxymethylcellulose to dry white wine. *Anal. Methods*, 3, 380-384.
- GREEFF A. E., ROBILLARD B., DU TOIT W. J. (2012). Short- and long-term efficiency of carboxymethylcellulose (CMC) to prevent crystal formation in South African wine. *Food Addit Contam: Part A*, 29, 1374-1385.
- REGULAMENTO (CE) n° 606/2009. “Jornal Oficial da União Europeia” (24-7-2009).
- OIV (2013). Codex International Organization of Vine and Wine. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. França: Paris.
- OIV (2012). Recueil de Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts. Edition Officielle. Paris.
- RIBEIRO T., FERNANDES C., NUNES F. M., FILIPE-RIBEIRO L., COSME F. (2014). Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chem.*, 159: 47-54.
- GUISE R., FILIPE-RIBEIRO L., NASCIMENTO D., BESSA O., NUNES F.M., COSME F. (2014). Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chem.* 156:250-257.

- BOSSO A., SALMASO D., FAVERI E., GUAITA M., FRANCESCHI D. (2010). The use of carboxymethylcellulose for the tartaric stabilization of white wines, in comparison with other oenological additives. *Vitis*, 49:95–99.
- BULLIO C. (2002). TartarCheck. User's Handbook, Ing. C. Bullio, San Prospero, Italy, version 5/2/02.
- RIBÉREAU-GAYON P., PEYNAUD E., SUDRAUD P. (1982). Science et Techniques du vin. Tome 4. Dunod: Paris.
- KRAMLING T. E., SINGLETON V. L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 20, 86-92.

EFEITO DA APLICAÇÃO DE PRODUTOS ENOLÓGICOS NA ELIMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM VINHO BRANCO

Ana Beatriz FERREIRA¹; Davide SILVA¹, Cátia ROCHA¹; António INÊS²; Fernando M. NUNES³; Luís FILIPE-RIBEIRO¹; Luís ABRUNHOSA⁴, Fernanda COSME^{2*}

RESUMO

As aflatoxinas, quimicamente definidas como difuranocumarinas, são metabolitos secundários produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O presente trabalho teve como objetivo estudar a ação de diferentes tipos de produtos enológicos na remoção de aflatoxinas (B1 e B2) presentes no vinho. A eficácia desses produtos na remoção das referidas micotoxinas foi avaliada utilizando vinho artificialmente contaminado com AFB1 e AFB2. O produto enológico que mostrou ser mais eficaz na remoção destas micotoxinas foi a bentonite, com percentagem de remoção de 100%. O caseinato de potássio também se mostrou eficaz, com percentagem de remoção na ordem dos 70 a 80%. Adicionalmente também se avaliou o impacto destes produtos enológicos sobre as características físico-químicas dos vinhos. Os resultados obtidos podem fornecer informações úteis para o sector vitivinícola, na seleção do produto enológico mais apropriado na remoção das aflatoxinas, reduzindo a toxicidade e melhorando simultaneamente a qualidade e segurança alimentar do vinho.

Palavras-chave: aflatoxinas, produtos enológicos, vinho, cor, composição fenólica

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas, são metabolitos secundários tóxicos de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos, habitualmente, no final da fase exponencial do seu crescimento (GONÇALEZ *et al.*, 2001). As principais micotoxinas conhecidas são

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001 -801 Vila Real.

² Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001 -801 Vila Real, Portugal.

³ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Química, Vila Real, Portugal.

⁴ CEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. *Email** fcosme@utad.pt

produzidas por fungos que pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, destacando-se as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos (desoxivalenol, nivalenole toxina T-2) e zearelenona (BATA e LASZTITY, 1999; SERRA *et al.*, 2005).

Estas micotoxinas são encontradas sobretudo em alimentos de origem vegetal, nomeadamente cereais, frutas, sumos de fruta, cacau, café, vinho, frutos secos e especiarias, e com menor frequência em alimentos de origem animal, leite e produtos lácteos, como queijos e iogurtes (COLAK *et al.*, 2006; VAN DE PERRE *et al.*, 2015). Como são compostos muito estáveis, são difíceis de eliminar da cadeia alimentar, provocando perdas elevadas em certas produções agrícolas a nível mundial (VAN DE PERRE *et al.*, 2015). No entanto, o teor de micotoxinas presentes nos diversos alimentos pode ser controlado pela aplicação de medidas de controlo e prevenção adequadas, tais como a implementação de um plano HACCP (SERRA *et al.*, 2005).

As aflatoxinas são um grupo vasto de compostos que são agrupadas nas séries B, G, M, P e Q tendo em conta algumas diferenças de estrutura química e a disposição dos átomos de carbono. Dentro de cada uma destas séries encontram-se agrupados vários compostos: e.g AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}; AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}; AFG₁ e AFP₁ (CARVAJAL, 2013). Existem cerca de 20 tipos diferentes de aflatoxinas, mas devido ao seu alto potencial cancerígeno, mutagénico e teratogénicos mais importantes são AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ (Figura 1).

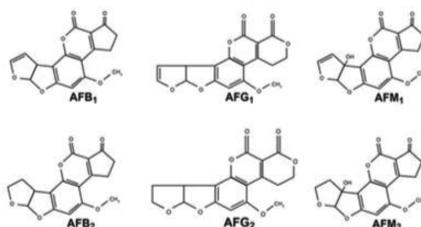


Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas (SORIANO DEL CASTILLO *et al.*, 2007).

O vinho como qualquer outro produto alimentar está suscetível à contaminação por micotoxinas. A deterioração das uvas tem sido tradicionalmente associada ao desenvolvimento de fungos filamentosos em que a produção de micotoxinas pode ocorrer antes da colheita das uvas ou em situações de pós-colheita, quando as uvas estão mais suscetíveis a danos (SERRA *et al.*, 2004). Para a saúde humana, a micotoxina que suscita mais preocupações nos vinhos é a ocratoxina A (HOCKING *et al.*, 2007). No entanto, algumas aflatoxinas, principalmente AFB₁ e AFB₂, têm sido também encontradas em uvas, mostos e vinhos, embora com menor frequência (EL KHOURY *et al.*, 2008).

O Instituto da Vinha e do Vinho estabelece que o teor máximo de ocratoxina A presente nos vinhos tem de ser inferior a 2,0 µg/kg. Em relação à presença de aflatoxinas nos vinhos, o teor máximo admissível não se encontra legislado.

A aplicação de técnicas de redução de aflatoxinas em vinhos está ainda pouco estudada. No entanto, a preocupação que a presença de aflatoxinas suscita leva a que se investiguem estratégias de prevenção de forma a reduzir a sua formação em alimentos, bem como, de eliminação, inativação ou redução da biodisponibilidade destas toxinas nos alimentos contaminados. Um dos métodos de descontaminação/redução passa pela utilização de agentes adsorventes que se podem ligar de forma eficiente e assim remover micotoxinas de uma solução aquosa (VAR *et al.*, 2008). O carvão activado e as bentonites são os adsorventes mais estudados e que possuem maior afinidade para as micotoxinas (HUWIG *et al.*, 2001).

Apesar de haver muitos estudos que incidem na descontaminação de micotoxinas utilizando agentes adsorvente, ainda não existe nenhum trabalho de investigação sobre remoção de aflatoxinas nos vinhos como existe para a ocratoxina A. Assim, foi objectivo deste trabalho estudar a ação de diferentes produtos enológicos na eficiência de remoção de aflatoxina B1 e B2 de um vinho branco artificialmente contaminado. Foi ainda estudada a ação destes produtos enológicos nos parâmetros da cor, compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides de vinho branco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vinho

Neste trabalho foi utilizado um vinho branco, com as seguintes características: Teor alcoólico 10,0 % (v/v); Massa volúmica a 20°C 0,9915 (g/cm³); pH 3,0; Acidez total 6,7 (g ácido tartárico/L); Acidez volátil 0,14 (g ácido acético/L); Sulfuroso livre 35 (mg/L). As análises dos parâmetros convencionais do vinho foram efetuadas de acordo com os métodos oficiais da OIV (OIV, 2013).

2.2 Ensaio de colagem

No ensaio de colagem utilizaram-se dez produtos enológicos comerciais com características diferentes (mistura de carvão, gelatina e bentonite – CG; carvão – C; proteína de ervilha – PE; manoproteína – BPI; polivinilpirrolidona – PVPP; caseinato de potássio – CP; bentonite sódica – BS; carboximetilcelulose – CMC; bentonite cálcica – B; quitosano – Q). Estes produtos enológicos foram aplicados na dose média recomendada pelos fabricantes em provetas de 250 mL, com o objetivo de avaliar a sua capacidade para remover as aflatoxinas utilizando um vinho branco artificialmente contaminado com 10 µg/L de AFB1 e 10 µg/L de AFB2. O ensaio de colagem foi efetuado em duplicado para cada um dos produtos enológicos e para o controlo (vinho sem adição de produto enológico).

2.3 Análise de AFB1 e AFB2

O sobrenadante do vinho adicionado com os diferentes produtos enológicos foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 min. De seguida, recolheram-se 2 mL de sobrenadante e adicionou-se igual volume de acetonitrilo/metanol/ácido acético (78:20:2, v/v/v). A separação cromatográfica foi realizada a 35 °C numa coluna analítica C18 de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm, 5 µm) equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. As amostras foram eluídas a um caudal de 1 mL/min durante 30 min com uma fase móvel composta por H₂O/acetonitrilo/metanol (3:1:1, v/v/v). O volume de injeção foi de 30 µL e os parâmetros de detecção: $\lambda_{exc}=365$ nm, $\lambda_{em}=435$ nm e gain=1000 (SOARES *et al.*, 2010). O tempo de retenção da AFB1 e AFB2 foi aproximadamente de 26 e 21 min, respetivamente. A concentração de AFB1 e de AFB2 nas amostras foi determinada por comparação das áreas dos picos com uma curva de calibração efetuada com padrões de AFB1 e AFB2 (Sigma-Aldrich). Todas as análises foram efectuadas em duplicado.

2.4 Análise de alguns parâmetros físico-químicos do vinho

A cor foi determinada pela medição da absorvância a 420 nm, utilizando uma célula de 1 cm de percurso ótico, num espectrofotómetro, de acordo com o método descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2013). Determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos foi efectuada de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não-flavonóides foram determinados de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais obtivemos os compostos fenólicos flavonóides. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração elaborada com o ácido gálico. Todas as análises foram efectuadas em duplicado.

2.5 Tratamento estatístico dos dados

Para o tratamento estatístico dos dados aplicou-se a análise de variância ANOVA (fator único), seguido de um teste de comparação de média, teste de Tuckey utilizando o programa Statistica versão 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da concentração das aflatoxinas B₁ e B₂ no vinho branco

Os produtos enológicos mais eficazes na redução da concentração da aflatoxina B1 (AFB1) foram as duas bentonites, sódica (BS) e cálcica natural (B) com remoções

de 100% desta micotoxina. O carvão ativado (C), o caseinato de potássio (CP) e a mistura de carvão, bentonite e gelatina (CG) também obtiveram uma redução significativa da concentração desta toxina (Figura 2). Relativamente à eficácia dos produtos enológicos sobre a remoção da aflatoxina (AFB2), apenas a bentonite cálcica natural (B) obteve um resultado igual ao observado na remoção da AFB1, reduzindo na totalidade a concentração desta toxina. A bentonite sódica (BS), caseinato de potássio (CP), carvão (C) e mistura de carvão, bentonite e gelatina (CG), também podem ser uma boa alternativa na remoção de AFB2. Os restantes produtos enológicos testados não revelaram bons resultados na remoção das duas aflatoxinas (AFB1 e AFB2).

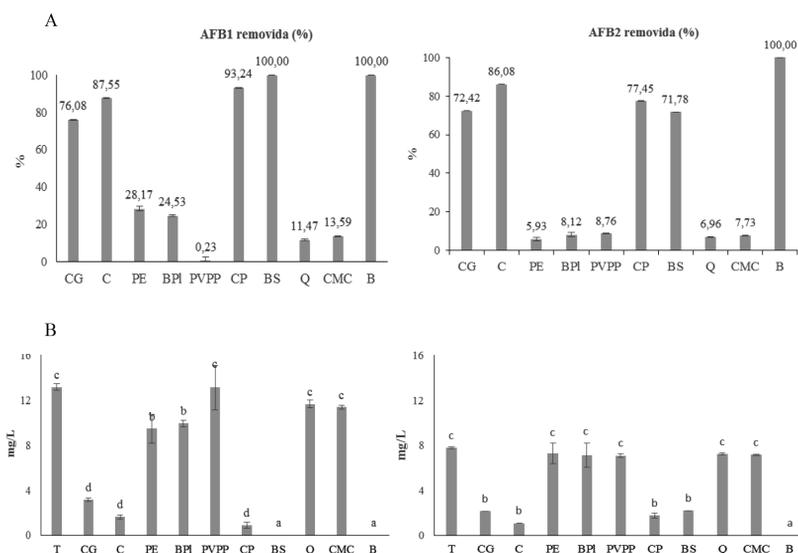


Figura 2. Percentagem de remoção (A) e de concentração detetada (B) da AFB1 e AFB2 após a ação dos produtos enológicos aplicados no vinho branco. Ensaio com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

A bentonite foi de todos os produtos utilizados o que revelou resultados mais satisfatórios. Este produto enológico já foi testado na remoção de outras aflatoxinas, nomeadamente da AFM1, frequentemente presente no leite, tendo-se obtido uma percentagem de remoção de 80% (DI NATALE *et al.*, 2009). O carvão também demonstrou elevada eficiência na remoção (93%) da AFM1 e na remoção da ocratoxina A em vinho branco (VAR *et al.*, 2008).

3.2 Efeito da aplicação dos produtos enológicos na cor do vinho branco

Na Figura 3 pode-se observar que todos os produtos enológicos que demonstraram capacidade para remover a AFB1 e AFB2 no vinho branco, ou seja, a mistura de carvão, gelatina e bentonite (CG), o carvão (C), o caseinato de potássio (CP) e as duas bentonites (B, BS), diminuíram a cor do vinho significativamente, quando comparado com a testemunha. O quitosano (Q), o CMC e a manoproteína (BP1), foram os produtos que não alteraram a cor do vinho, mas também não demonstraram capacidade para remover as aflatoxinas.

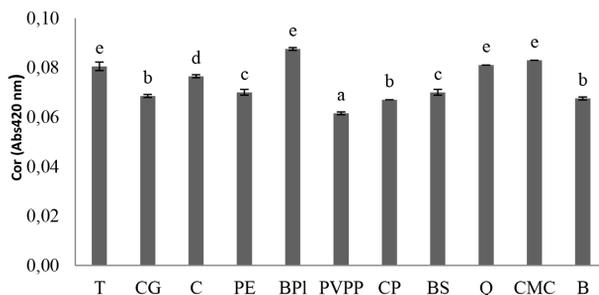


Figura 3. Efeitos dos diferentes produtos enológicos na cor do vinho branco. Ensaios com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

3.3 Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor de compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho branco

Como se pode observar na Figura 4, houve reduções significativas nos compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides, pela ação dos produtos enológicos. Em relação aos compostos fenólicos totais, a mistura de carvão, gelatina e bentonite (CG) e a bentonite sódica (BS) não demonstrou alterações significativas, o mesmo não ocorreu com o caseinato de potássio (CP) e com o carvão (C) onde se verificaram reduções significativas. Nos flavonóides e não flavonóides também se verificaram reduções significativas com a exceção da bentonite cálcica (B) que não alterou o teor de compostos fenólicos não flavonóides. Por outro lado, o quitosano (Q) e o CMC não provocaram redução no teor dos compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides.

O caseinato de potássio (CP) quando aplicado em vinhos brancos tem tendência a diminuir a concentração dos compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides (COSMEet *al.*, 2012), confirmando-se esse fato com a exceção dos compostos não flavonóides.

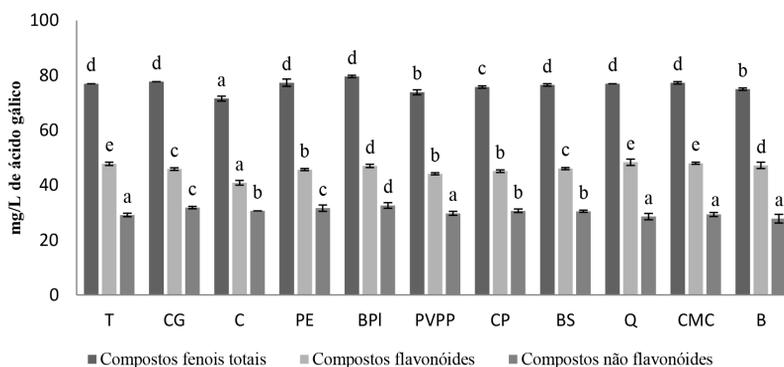


Figura 4. Efeitos dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho branco. Ensaio com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho o objetivo principal foi encontrar um ou mais produtos enológicos com capacidade de remoção da aflatoxina B1 e B2 por meio da adsorção, mas que simultaneamente fossem capazes de preservar as características físico-químicas do vinho tratado. Os resultados obtidos fornecem informações úteis para o sector vitivinícola, que podem assim selecionar o produto enológico mais apropriado para a remoção das aflatoxinas, reduzindo a toxicidade e melhorando simultaneamente a qualidade e segurança alimentar do vinho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por fundos do FEDER através do COMPETE e por fundos nacionais através da FCT -01-0124-FEDER-028029 e PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respetivamente. Este trabalho foi também financiado pelo IBB/CGB-UTAD e Centro de Química Vila Real (CQ-VR). Agradecimentos adicionais também às empresas SAI Lda., AEB Bioquímica Portuguesa, S. A. e Enartis pelo fornecimento dos produtos enológicos. LuísAbrunhosa recebeu apoio através da bolsa UMINHO/BPD/51/2015 do projeto UID/BIO/04469/2013 financiado por FCT/MEC (OE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATA A., LASZTITY R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci Technol.* 10, 223-228.
- CARVAJAL M. (2013). Transformación de la Aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano. *Aducto AFB1-ADN. D.R. TIP Revista Especializada enCiencias Químico-Biológicas.* 16(2), 109-120.
- COLAK H., BINGOL E.B., HAMPIKYAN H., NAZLI B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *J. Food Drug Anal.* 14, 292-296.
- COSME F., CAPÃO I., FILIPE-RIBEIRO L., MENDES-FAIA A. (2012). Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physico chemical and sensory characteristics. *LWT-Food Sci Technol.* 46, 382- 387.
- DI NATALE F., GALLO M., NIGRO R. (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *J. Food Eng.* 95, 186-191
- EL KHOURY A., RIZH T., LTEIF R., AZOURI H., DELIA M., LEBRIHI A. (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine - grapes and musts. *Food Chem Toxicol.* 46, 2244-2250.
- SOARES C., RODRIGUES P., FREITAS-SILVA O., ABRUNHOSA L., VENÂNCIO A. (2010). Rapid HPLC method for simultaneous detection of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *World Mycotoxin Journal.* 3(3), 225-231.
- GONÇALEZ E., PINTO M.M., FELICIO J.D. (2001). Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico.* 63(1/2), 15-9.
- HOCKING A.D., LEONG L.S., KAZI A.B., EMMETT R.W., SCOTTE.S. (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 8488.
- HUWIG A., FREIMUND S., KAPPELI O., DUTLER H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.* 122, 179-188.
- KRAMLING T.E., SINGLETON V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *Am. J.Enol.Viticult,* 20, 86-92.
- OIV - Organisation International de la Vigne et du Vin (2013). *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.
- SERRA R., BRAGA A., VENÂNCIO A. (2005).Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res Microbiol.* 156, 515-521.
- SERRA R., MENDONÇA C., ABRUNHOSA L., PIETRI A., VENÂNCIO A. (2004).Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Anal Chim Acta* 513, 41-47.
- SORIANO DEL CASTILLO J.M. (2007). *Micotoxinas en alimentos España: Ediciones Díaz de Santos.* VAN DE PERRE E., JACXSSENS L., LACHAT C., EL TAHAN F. (2015).Impact of maximum levels in European legislation on exposure of mycotoxins in dried products: Case of aflatoxin B1 and ochratoxin A in nuts and dried fruits. *Food Chem Toxicol.* 75, 112-117.
- VAR I., KABAK B., ERGINKAYA E. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in White wine, following treatment with activated carbón and sodium bentonite. *Food Control.* 19, 592-598.

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE RESINAS CATIÓNICAS NA ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA NAS CARACTERÍSTICAS DE VINHOS TINTOS DO DÃO

Fernando J. GONÇALVES^{1,2}; Raquel CARANEIRO²; Carlos SILVA³

RESUMO

A utilização de resinas permutadoras de catiões é um procedimento usado na estabilização tartárica de vinhos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da estabilização por resinas catiónicas nas propriedades de vinhos tintos do Dão. Neste trabalho foi usado um permutador de resinas catiónicas STABYMATI Eco-pHmetro SEKO-190912.

Foram analisados cinco vinhos tintos, variando a percentagem (5-20%) de vinho estabilizado por esta metodologia. Observou-se um aumento da acidez total e da acidez fixa e um abaixamento do pH dos vinhos. A nível da composição mineral, verificou-se um abaixamento dos teores de ferro, cálcio e potássio. Os resultados mostraram esta tecnologia pode, do ponto de vista físico-químico, ser usada na estabilização tartárica dos vinhos.

Palavras chave: Vinho, estabilização tartárica, resinas catiónicas

1. INTRODUÇÃO

A estabilização tartárica é um fenómeno importante para a qualidade dos vinhos porque previne a precipitação tartárica, ou seja, o aparecimento de cristais no fundo do depósito ou da garrafa.

O ácido tartárico encontra-se no vinho em concentrações consideravelmente elevadas, entre 2 e 6 g/L. Ao pH do vinho, e devido à presença de iões potássio e cálcio, o ácido tartárico pode encontrar-se salificado em cinco formas diferentes. Este ácido pode precipitar sob a forma de bitartarato de potássio e/ou tartarato neutro de cálcio que são os sais responsáveis pela instabilidade tartárica nos vinhos. Este fenómeno pode ocorrer naturalmente durante a vinificação ou conservação de um vinho. Esta precipitação está dependente de fatores como a temperatura, o teor alcoólico e o teor em coloides protetores ou da presença de núcleos de cristalização, entre outros.

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

² Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, Portugal

³ UDACA - União das Adegas Cooperativas do Dão UCRL, Viseu, Portugal

Os métodos utilizados para a estabilização tartárica dos vinhos são de natureza física ou química. Os primeiros baseiam-se na refrigeração, e os segundos na eliminação parcial de potássio por via eletroquímica e na utilização de inibidores de cristalização (Cardoso, 2007). A estabilização pelo frio nem sempre é totalmente eficaz, pelo que pode ser feita a adição de ácido metatartárico, manoproteínas, ou carboximetilcelulose para aumentar a estabilidade dos vinhos.

Os métodos químicos são mais rápidos, eficazes e acessíveis que os físicos (Nunes, 2011), no entanto são mais propícios a provocar alterações organoléticas nos vinhos. A recurso à eletrodialise ou a resinas catiónicas são formas de reduzir a quantidade de potássio nos vinhos, contribuindo para a sua estabilização tartárica.

A estabilização por permuta iónica não afeta significativamente a qualidade do vinho. O tratamento consiste na passagem do vinho por uma coluna que contém resinas na forma catiónica. A resina catiónica pode estar carregada com iões de sódio e/ou de hidrogénio. Durante o processo de estabilização por resinas catiónicas, estes iões são permutados com iões potássio, cálcio e/ou magnésio. Esta permuta resulta na formação de bitartarato de sódio que por sua vez é mais solúvel do que o bitartarato de potássio, havendo uma redução da acidez (Dharmadhikari, 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e estudar os efeitos em parâmetros físico-químicos de vinhos do Dão após o processo de estabilização tartárica pelo uso de resinas catiónicas.

2. AMOSTRAS E MÉTODOS

Neste estudo foram usados 5 vinhos tintos, classificados com Denominação de origem Dão, tendo sido designados de VTA, VTB, VTC, VTD e VTE.

De cada um dos vinhos, 1000 L foram sujeitos ao tratamento de estabilização tartárica por permuta de iões, utilizando um equipamento da marca STABYMATIc ECO. De cada um dos vinhos, foram analisados o vinho testemunha (VT), o vinho estabilizado (VE) e vinhos loteados com diferentes percentagens de vinho submetido ao processo de estabilização: VE5, VE10, VE15, VE20, respetivamente com 5, 10, 15 e 20% de vinho estabilizado, por se considerarem que seriam loteamentos com aplicação industrial.

As determinações analíticas foram realizadas em triplicado, de acordo com os métodos oficiais do OIV (OIV, 1990).

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1 EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS VINHOS

Os resultados obtidos para a acidez total, acidez volátil e acidez fixa, estão apresentados no quadro 1. A análise dos resultados obtidos descritos no Quadro 1 para acidez total permite verificar que os vinhos testemunha (VT) apresentam um valor de acidez total compreendido entre 4,9 e 5,6 g/L. Estes valores estão de acordo com

os descritos por Silva (2008), num estudo realizado em 2775 vinhos da região do Dão, em que o valor mínimo 3,6 g/L e o máximo 11,0 g/L e com valor médio 5,7g/L. A análise dos resultados permitiu, ainda, verificar que existiu em todos os vinhos um aumento da acidez total, com o aumento da percentagem de vinho estabilizado. No caso das amostras de vinho estabilizado, os valores de acidez total variaram entre 6,7 e 8,0 g/L, os quais podem ser considerados acima dos valores recomendados para vinhos tintos

Quadro 1 – Acidez Total, acidez fixa e acidez volátil dos vinhos em estudo.

	VT	VE5	VE10	VE15	VE20	VE
Acidez Total (g/L ácido tartárico)						
VT A	5,5±0,4	5,6±0,4	5,7±0,4	5,7±0,5	5,8±0,5	6,7±0,5
VT B	5,0±0,8	5,0±0,9	5,1±0,9	5,3±0,9	5,4±1,0	7,2±1,0
VT C	5,4±0,6	5,6±0,7	5,7±0,7	5,6±0,7	5,7±0,7	7,2±0,7
VT D	5,6±0,9	5,8±0,9	5,9±0,1	5,9±1,2	6,0±1,3	8,0±1,4
VT E	4,9±0,8	4,9±0,9	5,0±0,9	5,4±0,9	5,4±1,0	7,2±0,1
Acidez Fixa (g/ L ácido tartárico)						
VT A	4,8±0,5	4,9±0,4	5,1±0,4	5,1±0,5	5,0±0,5	6,0±0,5
VT B	4,3±0,9	4,4±0,9	4,5±1,0	4,7±1,0	4,8±1,0	6,7±1,1
VT C	4,9±0,7	5,0±0,7	5,1±0,7	5,1±0,8	5,2±0,8	6,8±0,8
VT D	4,8±0,9	5,1±0,9	5,1±1,0	5,0±1,2	5,3±1,5	7,3±1,3
VT E	4,4±0,8	4,4±0,9	4,5±0,9	4,9±0,9	4,8±0,9	6,7±1,0
Acidez Volátil (g/L ácido acético)						
VT A	0,61±0,03	0,57±0,03	0,62±0,04	0,59±0,06	0,59±0,07	0,53±0,05
VT B	0,54±0,07	0,51±0,07	0,49±0,08	0,49±0,08	0,49±0,07	0,40±0,07
VT C	0,46±0,04	0,43±0,04	0,47±0,04	0,40±0,14	0,42±0,15	0,38±0,14
VT D	0,70±0,08	0,66±0,08	0,65±0,08	0,68±0,08	0,61±0,08	0,61±0,08
VT E	0,46±0,04	0,46±0,03	0,45±0,03	0,45±0,03	0,46±0,04	0,45±0,05

No que diz respeito à acidez fixa, o intervalo de valores dos vinhos VT variou entre 4,3 e 4,9 g/L. Os vinhos loteados com vinho estabilizado apresentavam valores superiores, relativamente ao vinho testemunha. As amostras constituídas exclusivamente por vinho estabilizado (VE) apresentavam os valores mais elevados de acidez fixa, estando compreendidos entre 6,0 e 7,3 (g/ L ácido tartárico).

Relativamente à acidez volátil, pode afirmar-se que existiu uma tendência para uma ligeira diminuição deste parâmetro, nos vinhos submetidos a estabilização.

Todos os valores estão de acordo com o limite legal ($\leq 1,2$ g/L ácido acético) estabelecido para vinhos tintos. No global, todos os vinhos apresentavam valores adequados para conservação dos vinhos. Estes resultados mostram que o aumento da acidez total se deveu ao aumento da acidez fixa.

O Quadro 2 mostra os valores obtidos para os diferentes vinhos em estudo. O pH dos vinhos testemunha, possuíam valores recomendados para vinhos tintos do Dão (3,3 a 3,6). Estes valores estão de acordo com valores de pH descritos na bibliografia por Silva (2008) e Marques (2012) para valores de vinhos tintos desta região.

Quadro 2 – pH dos vinhos em estudo..

	VT	VE5	VE10	pH	VE15	VE20	VE
VT A	3,4 \pm 0,3	3,3 \pm 0,3	3,3 \pm 0,3		3,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3
VT B	3,6 \pm 0,5	3,5 \pm 0,6	3,5 \pm 0,6		3,2 \pm 0,6	3,2 \pm 0,6	2,0 \pm 0,6
VT C	3,3 \pm 0,4	3,2 \pm 0,4	3,2 \pm 0,4		3,1 \pm 0,5	3,1 \pm 0,6	2,2 \pm 0,6
VT D	3,6 \pm 0,5	3,6 \pm 0,5	3,5 \pm 0,6		3,6 \pm 0,6	3,4 \pm 0,6	2,2 \pm 0,6
VT E	3,4 \pm 0,5	3,3 \pm 0,5	3,3 \pm 0,6		3,3 \pm 0,6	3,2 \pm 0,7	2,0 \pm 0,0

O pH dos vinhos submetidos a estabilização (VE) variou entre 2,0 e 2,6 demonstrando uma diminuição acentuada do pH para valores que não são adequados para vinhos equilibrados química e sensorialmente. Esta diminuição está de acordo com o descrito por Lasandra et al, (2013) para vinhos tratados com resinas de troca iônica, embora usando equipamento diferente. No entanto, no caso dos valores para as amostras de lote com 20% de vinho tratado, o decréscimo do de pH relativamente aos vinhos testemunha foi em média 0,2, variando entre 3,1 e 3,4.

3.2 EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS MINERAIS DOS VINHOS

O quadro 3 mostra os teores de ferro, cobre e cálcio obtidos para os diferentes vinhos em estudo. O VTA apresentava um valor (11,3 mg/L) de ferro muito superior aos restantes vinhos testemunha (3,2-6,0 mg/L), que apresentavam valores adequados para vinhos tintos da região do Dão. Todos os vinhos apresentavam valores dentro do limite legal (< 12 mg/L). O tratamento de estabilização por resinas originou vinhos (VE) com valores (0,7-2,0 mg/L) muito mais baixos de ferro. Esta diminuição está de acordo com o estudo de Lasandra et al (2013). No entanto, os vinhos loteados com 20% de vinho estabilizado, apresentavam uma redução dos teores de ferro entre 9 e 24%.

Quadro 3 – Concentração de ferro (mg/L), cobre (mg/L) e Cálcio (mg/L) nos vinhos em estudo.

	VT	VE5	VE10	VE5	VE20	VE
Ferro (mg/L)						
VT A	11,3	10,6	9,5	9,9	8,6	0,7
VT B	5,2	5,1	5,3	4,8	4,6	0,8
VT C	3,8	3,8	3,4	3,3	3,3	1,1
VT D	5,5	5,2	5,4	5,0	5,0	2,0
VT E	6,0	5,8	5,8	4,9	4,7	0,7
Cobre (mg/L)						
VT A	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VT B	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
VT C	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
VT D	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
VT E	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cálcio (mg/L)						
VT A	94	84	80	75	67	20
VT B	70	64	58	60	102	20
VT C	61	50	52	52	67	21
VT D	78	89	68	64	83	20
VT E	72	70	66	72	61	20
Potássio (mg/L)						
VT A	1114	918	902	820	799	215
VT B	1236	1177	1132	1060	1047	79
VT C	1081	1041	969	942	912	143
VT D	1656	1548	1373	1356	1384	152
VT E	1293	1263	1199	1417	1044	79

Relativamente aos valores de cobre, encontravam-se dentro do limite legal (<1 mg/L) descrito para vinhos tintos. Os resultados obtidos não mostraram um efeito desta tecnologia nos teores de cobre dos vinhos. Os resultados estão de acordo com a bibliografia (Silva, 2008; Marques, 2012) e

Os teores de cálcio, descritos na tabela 3, variaram entre 61 mg/L para o VTC e 94 mg/L do VTA, também o mais rico em ferro. Pela observação dos resultados, pode afirmar-se, que os vinhos loteados com maior percentagem de vinho estabilizado possuíam teores mais baixos de cálcio. No caso dos vinhos VE, os valores variaram entre 20 e 21 mg/L, o que corresponde a uma diminuição compreendida entre 66 e 79 %, relativamente aos vinhos VT.

O tratamento com resinas catiónicas provocou uma diminuição dos teores de potássio (mg/L) presentes nos vinhos (Quadro 3). Os vinhos VE apresentavam entre 6 e 19% dos valores presentes nos respetivos vinhos testemunha. Os valores obtidos para os vinhos testemunha (1081-1656 mg/L) estão próximos dos obtidos por Marques (2012), que variaram entre 1200 a 1706 mg/L.

4. CONCLUSÃO

O tratamento dos vinhos com resinas catiónicas levou a um claro abaixamento do pH e ao aumento da acidez total e fixa dos vinhos estudados. Esta metodologia de estabilização tartárica originou uma redução nas concentrações de cálcio e potássio nos vinhos. Esta diminuição pode ser importante para uma maior estabilidade dos vinhos, uma vez que estes metais são os principais intervenientes na formação de cristais de tartarato.

Os resultados, permitem inferir, que o sucesso da aplicação desta tecnologia está dependente da percentagem de vinho tratado nos lotes. Em geral, as amostras dos vinhos estudados contendo entre 5 e 20% de vinho estabilizado apresentaram características que podem ser consideradas adequadas para vinhos do Dão, podendo ser aplicáveis a nível industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardoso, António Dias (2007). O vinho da uva à garrafa. Âncora Editora, Lisboa: Dharmadhikari, M. 1994. Methods for Tartrate Stabilization of Wine. Tech. Iowa State.
- Lasanta, C., Caro, I., Pérez, L (2013): The influence of cation exchange treatment on the final characteristics of red wines. Food Chemistry. 138, 1072–1078.
- MARQUES, *Marina Raquel Loureiro – Caracterização físico-química e fenólica de vinhos tintos da colheita de 2011 da região demarcada do Dão.* (2012) Trabalho Final de Curso, Eng^a Alimentar, ESAV, Instituto Politécnico de Viseu.
- Nunes, M.D.A; Laureano, O; Costa, F.T (2011) A electrodiálise na estabilidade tartárica dos vinhos. Comparação com o método clássico. Tese de Mestrado, ISA, Universidade Técnica de Lisboa.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et moûts. Ed. Officielle. Paris, 1990.

EFFECT OF THE FOLIAR APPLICATION OF YEAST DERIVATIVES ON GRAPE COMPOSITION AND RESULTING WINES

Vanesa GONZÁLEZ, Javier TÉLLEZ, José Ramón LISSARRAGUE
Grupo de Investigación en Viticultura. Universidad Politécnica de Madrid, Spain.
gi.viticultura@upm.es

ABSTRACT

2015 has been confirmed as the warmest year globally since records. These changing climatic conditions represent a challenge in many grape growing regions compromising a balanced technological, phenolic and aromatic maturity, resulting in unbalanced wines. This study tested the foliar application of yeast derivatives at the beginning of the ripening phase on *Vitis vinifera L.* cvs. Sauvignon Blanc and Cabernet Sauvignon, in a warm grape growing region (Albacete, Spain). Parameters related to vine physiology and productivity, and grape composition were followed during the ripening. Experimental wines were elaborated to assess the possible sensorial differences due to the foliar treatments. Sauvignon Blanc grapes from treated vines showed an increase in the percentage of skin thickness and a higher concentration of glycosylated aroma precursors compared to non-treated. In cv. Cabernet Sauvignon, grapes from treated vines presented a higher concentration of tannins. In both varieties no differences were found regarding vine physiology or yield components. Wines from treated grapes were described as more mature and with less green character in both cvs. Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc.

AIMS

Our research team have experimented during 2015 the application of two yeast derivatives products in the vineyard: LalVigne™ Mature which aims to stimulate phenolic ripeness in red grapes varieties; LalVigne™ Aroma aims to stimulate aromatic precursors in white grapes and in both cases verify its influence on the agronomic responses in the vineyard.

THE VINEYARD:

Albacete (Spain) Dehesa de Luna 850 masl

- Sandy Clay Loan, 297 mm, GDD 1957 (2015)
- **Cabernet Sauvignon** (ENTAV 15) / 41B and **Sauvignon blanc** (ENTAV 316) / 41B
- Planted in 2005, 3 x 1.4 Sauvignon Blanc and 3 x 1.5 Cabernet Sauvignon Vine spacing
- N-S Orientated rows. VSP, Bilateral Cordon, 7 spurs pruned

THE EXPERIMENTAL DESIGN

- EXPERIMENT 1: CABERNET SAUVIGNON
 - Control and treatment LalVigne™ Mature (beginning of veraison)
- EXPERIMENT 2: SAUVIGNON BLANC
 - Control and treatment LalVigne™ Aroma (beginning of veraison)
- Four replicates, 30 vines per plot.
- Data collection 2015 and microvinification
- Analysis of variance: ns, —, — —, — — —, not significant, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$.

RESULTS

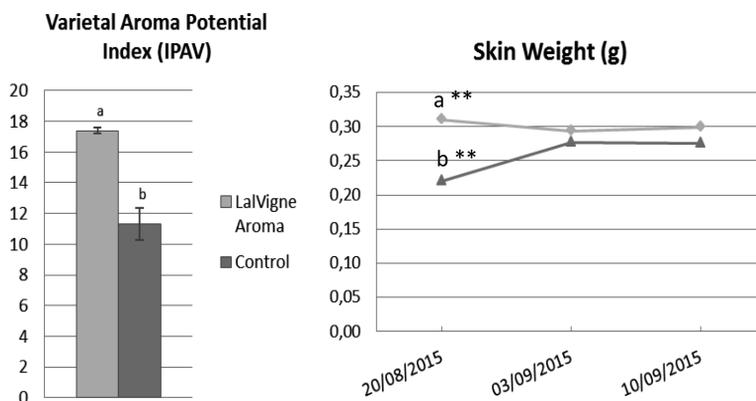


Figure 1: Varietal Aroma Potential Index and evolution of Skin Weight on Sauvignon Blanc grapes. Different letters represent a significant difference ($p < 0.05$). Multiple range test was used.



Figure 2: Harvest and winemaking following the method described by Sampaio et al. 2007.

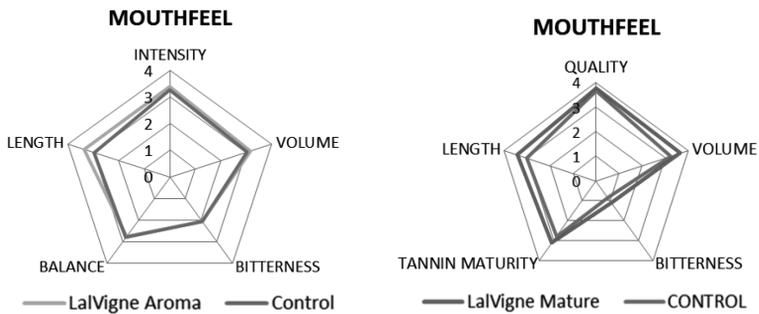


Figure 3: Taste analysis in Sauvignon Blanc (left) and Cabernet Sauvignon (right) wines.

Sauvignon Blanc

	Yield (kg/m ²)	Cluster wt. (g)	Berry wt. (g)	Shoots /m ²	Shoot wt. (kg/m ²)	pH	°Brix
LalVigne Aroma	0,85	120,1	1,28	3,7	0,13	3,66	24,2
Control	0,84	116,0	1,18	3,8	0,15	3,70	25,3
Sig	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

Cabernet Sauvignon

	Yield (kg/m ²)	Cluster wt. (g)	Berry wt. (g)	Shoots /m ²	Shoot wt. (kg/m ²)	pH	°Brix
LalVigne Mature	0,58	122,3	0,95	2,5	0,17	3,50	26,90
Control	0,57	124,0	0,96	2,5	0,16	3,54	27,58
Sig	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

Figure 4: Yield components and must parameters at harvest for both cvs.

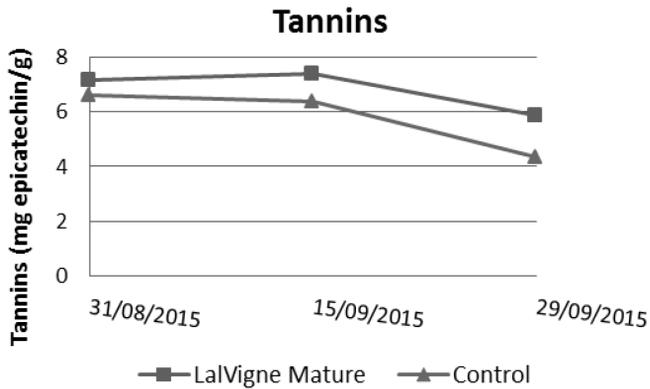


Figure 5: Evolution of Tannins in cv. Cabernet Sauvignon grapes

RESULTS AND DISCUSSION

The measure of the Varietal Aroma Potential Index (IPAV) in grapes, that establish the concentration of glycosylated aroma precursors (Salinas et al., 2012; Serrano et al., 2014) showed that the foliar application of yeast derivatives at veraison increased the concentration of aroma precursors in grapes of cv. Sauvignon Blanc.

Accordingly, Suklje et al. (2016) also found modifications in wine chemical and sensory composition between wines from control and treated grapes with LalVigne Aroma on the same cultivar.

Furthermore treated grapes with LalVigne Aroma showed a higher skin weight as this research group found in previous trials with the same products on the same cultivars (Téllez et al., 2015); same results by Villangó et al. (2015) using a puncture test on cv. Syrah after the application of LalVigne Mature.

The evolution of grape tannins in cv Cabernet Sauvignon during ripening revealed a higher concentration in these phenolics in treated grapes than in control ones. Same results were observed by Lissarrague et al. (2014) and Téllez et al. (2015) applying the same yeast derivatives on cvs. Syrah and Cabernet Sauvignon respectively.

Besides, no significant differences have been observed by the application of yeast derivatives LalVigne Aroma or LalVigne Mature on vegetative growth, yield components or must quality parameters like °Brix, pH or Total Acidity.

Generally, wines from Sauvignon Blanc and Cabernet Sauvignon treated vines have shown a better mouthfeel on the sensory analysis.

ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA DE UM VINHO DO PORTO RUBY RESERVA POR ELECTRODIÁLISE: PROCESSO ALTERNATIVO À ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA PELO FRIO

Nuno JORGE¹; Alice VILELA^{2*}; António BRAGA³; Fernando M. NUNES⁴; Fernanda COSME²

RESUMO

A estabilização tartárica pelo frio é a operação unitária mais frequente em enologia para estabilizar

tartaricamente os vinhos. No entanto, esta é uma operação lenta e dispendiosa. A electrodiálise é um processo que pode também estabilizar o vinho quanto à instabilidade tartárica. Assim, o objectivo deste trabalho foi comparar o método de estabilização tartárica pelo frio com o método de electrodiálise, num Vinho do Porto Ruby reserva, quanto à eficiência da estabilização, composição fenólica e características sensoriais. Os resultados mostraram que os vinhos tratados pelo método de estabilização tartárica pelo frio tiveram uma diminuição significativa na intensidade da cor, antocianinas totais, pigmentos poliméricos e totais, compostos fenólicos totais e flavonóides. A análise sensorial mostrou que os vinhos tratados pelo método de electrodiálises foram mais pontuados nos descritores da limpidez, da intensidade da cor, persistência, equilíbrio, intensidade de sabor, qualidade aromática e intensidade. Este estudo fornece informação que poderá ser usado para seleccionar um método alternativo à estabilização tartárica pelo frio.

Palavras-chave: Região Demarcada do Douro, vinho do Porto Ruby Reserva, estabilização tartárica, electrodiálise, perfil fenólico, perfil sensorial.

1. INTRODUÇÃO

Existem atualmente vários processos para estabilizar tartaricamente o vinho, entre os quais a estabilização pelo frio, que é um processo de separação de sais iónicos instáveis naturais do vinho por arrefecimento a uma temperatura próxima do ponto de congelação do vinho (BOULTON *et al.*, 1996; UITSLAG *et al.*, 1996). A precipitação

⁽¹⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁽²⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Biologia e Ambiente - Edifício de Enologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

* fcosme@utad.pt

⁽³⁾ Sogrape Vinhos, S.A., Departamento de Enologia | Winemaker, 4430 - 809 Avintes, Portugal

⁽⁴⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

ocorre devido à instabilidade do ácido tartárico na sua forma de sal de bitartarato, que é conhecido como hidrogenotartarato de potássio (KHT). A estabilização tartárica pelo frio pode ter algumas desvantagens, uma vez que é um processo demorado, com altos custos de energia e de equipamento (LOW, 2007).

A electrodiálise é um processo que permite a separação de aniões e catiões de acordo com a sua carga eléctrica usando membranas selectivas sob a influência de uma corrente eléctrica (ESCUDIER *et al.*, 1993; BIAU e SIODLAK, 1997; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). A electrodiálise é ideal para a remoção de catiões, tais como potássio, cálcio, sódio e ácido tartárico. Os compostos fenólicos, polissacarídeos e aminoácidos não são afectados, assim como o material coloidal dos vinhos tintos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). A electrodiálise tem vantagens sobre os métodos tradicionais de estabilização tartárica do vinho, tais como, pouca influência sobre as suas características sensoriais. (CAMEIRA DOS SANTOS *et al.*, 2000). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar processos alternativos à estabilização tartárica pelo frio como a electrodiálise quer na eficiência de estabilização tartárica quer sobre as características físico-químicas e sensoriais de num vinho do Porto Ruby reserva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinho

Foi utilizado um Vinho do Porto Ruby reserva, obtido com castas tradicionais, como a Touriga Francesa, Tinta Roriz, Touriga Nacional, Tinta Barroca e Tinto Cão. Com as seguintes características: massa volúmica a 20° C (g/cm^3) 1,024; teor alcoólico (% vol.) 19,9; acidez titulável (g de ácido tartárico/L) 4,9; acidez volátil (g de ácido acético/L) 0,3; pH 3,5. A análise dos parâmetros enológicos convencionais foi realizada de acordo com os procedimentos descritos pelo OIV (OIV, 2013).

2.2. Ensaio de estabilização tartárica pelo frio e por electrodiálise

A estabilização tartárica pelo frio e por electrodiálise do vinho do Porto Ruby reserva foi realizada à escala semi-industrial, com e sem adição de goma-arábica. Para o processo de estabilização a frio, o vinho foi arrefecido até uma temperatura de -6 °C, e colocado em cubas de 250 L, durante 4 e 7 dias. No final de ambos os processos os vinhos foram filtrados. Ao vinho estabilizado pelo frio durante 4 dias e a uma parte do vinho sujeito ao processo de electrodiálise foi adicionado goma-arábica (40 g/hL). Todas as experiências e análises foram realizadas em duplicado.

2.3. Teste de estabilidade tartárica

Foi efectuado o teste da condutividade eléctrica (teste do minicontacto). Este teste baseia-se na determinação da condutividade eléctrica do vinho à temperatura de 0°C. A condutividade eléctrica é medida antes () e depois da adição de bitartarato de potássio () (BOULTON *et al.*, 1996.). Se $\Delta < 5\%$ o vinho é considerado estável.

2.4. Determinação da intensidade e tonalidade corante, antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais

A intensidade e tonalidade corante foram determinadas de acordo com o método descrito pelo OIV (OIV, 2013). As antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais foram determinados de acordo com SOMERS e EVANS (1977).

2.5. Determinação dos compostos fenólicos totais, flavonóides e não- flavonóides

Determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos foi efectuada de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não-flavonóides dos vinhos foram determinados de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais foram determinados os compostos fenólicos flavonóides.

2.6. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por um painel de provadores treinados. Todas as provas foram realizadas entre as 10:00 e as 12:00 h em cabines individuais e de acordo com os procedimentos da norma ISO 8589:2007. Oito atributos sensoriais foram avaliados incluindo visuais, aromáticos e gustativos.

2.7. Análise estatística

Os resultados da avaliação físico-química foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao Teste de Tuckey a 5% de significância para comparação entre as médias. Aos dados da análise sensorial foi aplicada uma Análise em Componentes Principais (ACP) e Análise de *Clusters* (pela distância Euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair-group average*). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* STATISTICA 2010 (Stat Soft Inc., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da estabilização pelo frio e por electrodiálise na estabilidade tartárica do vinho do Porto Ruby reserva

O Quadro 1 apresenta os resultados da estabilidade tartárica dos vinhos estabilizados pelos diferentes processos, usado o teste da condutividade eléctrica (teste do minicontacto). Os vinhos apresentaram-se estáveis independentemente do processo de estabilização usado.

Quadro 1- Teste da condutividade eléctrica (minicontacto) do vinho do Porto Ruby reserva após estabilização tartárica pelo frio e por electrodiálise.

Método de estabilização	Condutividade inicial	Condutividade final	$\Delta\mu\text{S/cm}$
F4/GA	909,6	893,6	1,76
F7	897,0	878,1	2,11
E/GA	709,8	699,6	1,44
E	711,0	699,7	1,59

Quatro dias estabilização pelo frio e adição de goma-arábica (F4/GA); sete dias estabilização pelo frio (F7); estabilização por electrodiálise e adição de goma-arábica (E/GA); estabilização por electrodiálise (E).

3.2. Efeito da estabilização pelo frio e por electrodiálises na intensidade e tonalidade corante, antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais

Os efeitos do tratamento pelo frio e da electrodiálise na intensidade corante, tonalidade, antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais estão apresentados no Quadro 2. Verificou-se que os vinhos estabilizados pelo frio tiveram uma diminuição significativa na intensidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais (Quadro 2).

Quadro 2 - Intensidade e tonalidade corante, antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais do vinho do Porto Ruby reserva sem tratamento de estabilização e do vinho do Porto Ruby reserva estabilizado pelo frio e por electrodiálise (media \pm desvio padrão).

Tratamento de estabilização	Intensidade	Tonalidade	Antocianinas totais (mg/L)	Antocianinas coradas	Pigmentos poliméricos	Pigmentos totais
T	1,98 \pm 0,00 ^e	0,842 \pm 0,000 ^e	231 \pm 0 ^d	2,52 \pm 0,00 ^b	6,49 \pm 0,00 ^c	14,73 \pm 0,01 ^e
F4/GA	1,34 \pm 0,00 ^b	0,693 \pm 0,001 ^d	101 \pm 1 ^b	1,96 \pm 0,04 ^a	5,18 \pm 0,04 ^b	12,22 \pm 0,00 ^b
F7	1,27 \pm 0,00 ^a	0,687 \pm 0,000 ^c	91 \pm 1 ^a	1,86 \pm 0,02 ^a	4,87 \pm 0,01 ^a	10,81 \pm 0,00 ^a
E/GA	1,66 \pm 0,00 ^d	0,682 \pm 0,001 ^b	109 \pm 0 ^e	2,38 \pm 0,13 ^b	6,49 \pm 0,14 ^c	14,14 \pm 0,00 ^d
E	1,61 \pm 0,00 ^c	0,677 \pm 0,000 ^a	107 \pm 1 ^c	2,35 \pm 0,00 ^b	6,26 \pm 0,03 ^c	13,38 \pm 0,07 ^c

Quatro dias estabilização pelo frio e adição de goma-arábica (F4/GA); sete dias estabilização pelo frio (F7); estabilização por electrodiálise e adição de goma-arábica (E/GA); estabilização por electrodiálise (E). * Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

3.3. Efeito da estabilização pelo frio e por electrodiálises no teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

Foi observado um decréscimo significativo no teor em compostos fenólicos totais em todos os vinhos estabilizados relativamente ao vinho não estabilizado (Quadro 3). O decréscimo mais acentuado foi verificado no vinho estabilizado pelo frio o que está de acordo com o observado por NUNES (2011).

Quadro 3- Compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides do vinho do Porto Ruby reserva sem tratamento de estabilização e do vinho do Porto Ruby reserva estabilizado pelo frio e por electrodiálise (media \pm desvio padrão).

Tratamento de estabilização	Fenóis totais (mg/L ácido gálico)	Não-flavonóides (mg/L ácido gálico)	Flavonóides (mg/L ácido gálico)
T	1849 \pm 1 ^c	242 \pm 0 ^d	1607 \pm 1 ^d
F7	1581 \pm 0 ^a	189 \pm 0 ^b	1392 \pm 0 ^a
F4/GA	1622 \pm 2 ^b	201 \pm 1 ^c	1422 \pm 1 ^b
E	1786 \pm 0 ^c	184 \pm 1 ^a	1603 \pm 1 ^c
E/GA	1840 \pm 2 ^d	188 \pm 1 ^b	1652 \pm 1 ^c

Quatro dias estabilização pelo frio e adição de goma-arábica (F4/GA); sete dias estabilização pelo frio (F7); estabilização por electrodiálise e adição de goma-arábica (E/GA); estabilização por electrodiálise (E). * Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

O Quadro 3 mostra também um decréscimo dos compostos fenólicos não-flavonóides em todos os vinhos estabilizados tartaricamente relativamente ao vinho não estabilizado. O decréscimo mais acentuado foi observado nos vinhos estabilizado por electrodiálise [estabilização por electrodiálise e adição de goma-arábica (E/AG) e estabilização por electrodiálise (E)]. Os compostos fenólicos flavonóides decresceram significativamente nos vinhos estabilizados pelo frio [estabilização pelo frio durante quatro dias com adição de goma arábica (F4/GA); estabilização pelo frio durante sete dias (F7)] contudo, nos vinhos estabilizados por electrodiálise não foram verificadas diferenças significativas relativamente ao vinho não estabilizado (Quadro 3).

3.4. Avaliação sensorial dos vinhos estabilizados pelo frio e por electrodiálises

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos na Análise de *Clusters* (distância euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair-group average*) após a análise sensorial dos diferentes vinhos. No *phenograma* (Figura 1), é possível observar a formação de três grupos, identificados a seguir: grupo 1, formado pelos vinhos estabilizados pelo frio durante sete dias (F7) e pelo vinho estabilizado pelo frio durante quatro dias com adição de goma-arábica (F4/GA); grupo 2, formado pelos vinhos estabilizados por electrodiálise (E) e pelos vinhos estabilizados por electrodiálise seguido de adição de goma-arábica (E/AG); grupo 3, composto apenas por um vinho pertencente ao vinho não estabilizado tartaricamente (T).

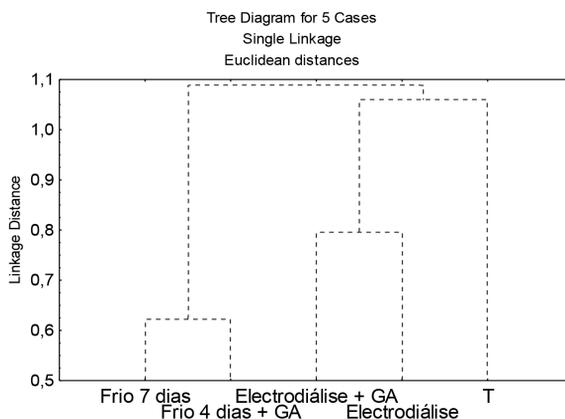


Figura 1 – *Phenograma* obtido após análise de *clusters* dos dados sensoriais dos quatro vinhos avaliados sensorialmente, comparados com o vinho não estabilizado tartaricamente (T).

Na análise em componentes principais (ACP) o primeiro componente contribuiu com 74,12% da variância total e o segundo com 19,87% (Figura 2, A), representando os dois primeiros componentes 93,99 % da variância total. Avaliando as projecções da figura (Figura 2, A e B) é possível visualizar a distribuição espacial das amostras avaliadas sensorialmente. Entre as qualidades sensoriais avaliadas, a “*intensidade de cor*”, “*tonalidade*” e “*limpidez*” foram os descritores sensoriais que contribuíram para a primeira componente – PC1 (Figura 2 A). Dois grupos distintos são formados: um grupo formado pelo vinho estabilizado pelo frio durante 7 dias (F7) e pelo vinho estabilizado pelo frio durante 4 dias com adição de goma-arábica (F4/GA), e outro grupo formado pelo vinho estabilizado por electrodiálise (E) e estabilizado por electrodiálise e adição de goma-arábica (E/GA) (Figura 2 B). A electrodiálise parece imprimir, aos vinhos, um aumento na “*intensidade aromática*”, “*persistência*”, “*equilíbrio*” e “*intensidade de flavor*”, relativamente à testemunha – vinho sem tratamento (T). Todos os métodos de tratamento tartárico estão longe do vinho não estabilizado (T), o que foi anteriormente mostrado pelo *phenograma* na Figura 1.

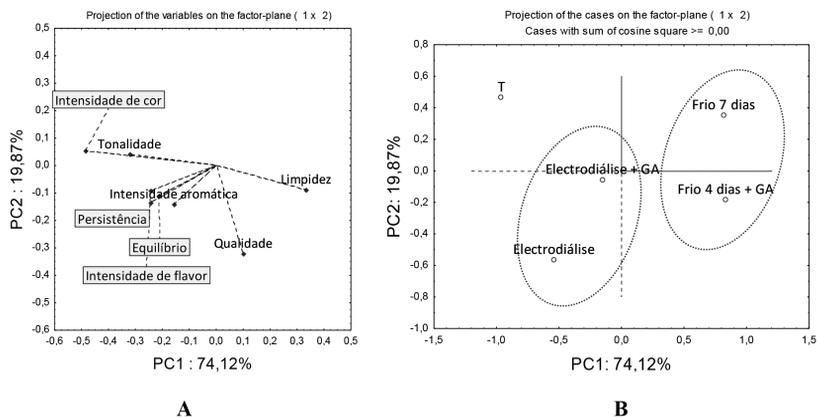


Figura 2 – Projeção dos atributos sensoriais nos dois componentes principais da ACP (A); Projeção da *cov*-ACP das amostras de vinhos avaliados sensorialmente (B).

4. CONCLUSÕES

Os vinhos do Porto Ruby reserva estabilizados pelo frio tiveram uma diminuição significativa na intensidade corante, antocianinas totais, pigmentos poliméricos e totais e nos compostos fenólicos totais, o que significa que este tratamento de estabilização tartárica foi responsável pela remoção de pigmentos e compostos responsáveis pela cor do vinho do Porto Ruby reserva. A análise sensorial dos vinhos mostrou que os vinhos do Porto Ruby reserva tratados por electrodiálise são mais pontuados para os descritores *limpidez*, *intensidade corante*, *persistência*, *equilíbrio*, *intensidade de sabor* e para a *intensidade* e *qualidade aromática*. Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir a electrodiálise como uma alternativa ao método de estabilização tartárica pelo frio.

AGRADECIMENTOS

À Sogrape Vinhos, S.A., pela disponibilização de vinhos, equipamentos e análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIAU G.; SIODLAK A. (1997). Conception, réalisation et utilisation d'une unité industrielle de stabilisation tartrique. *Revue Française d'œnologie*, 162: 18-20.
- BOULTON R; SINGLETON V.; BISSON L.; KUNKEE R. (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.
- CAMEIRA DOS SANTOS P.; PEREIRA J.; GONÇALVES O.M.; SIMÕES F.; PINHO M.N. (2000). Ensaios de estabilização tartárica em vinhos portugueses: Estudo comparativo da electrodiálise e de um método tradicional. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 15, 95-108.
- ESCUDIER J.L.; MOUTONNET M.; SAINT PIERRE B. (1993). Stabilisation tartrique des vins par électrolyse. *Revue des Oenologues*, 69S: 35-37.
- ISO 8589:2007 -Sensory analysis -- General guidance for the design of test rooms. KRAMLING T.E.; SINGLETON V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
- LOW L. (2007). Evaluation of Tartrate Stabilisation Technologies for Wine Industry. University of Adelaide.
- NUNES M.D.A. (2011). A Eletrodiálise na Estabilidade Tartárica dos Vinhos: comparação com o Método Clássico. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Viticultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- OIV (2013). International Methods of Analysis of Wines and Musts, Vol. 2. Edição oficial. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P.; GLORIES Y.; MAUJEAN A.; DUBOURDIEU D. (2006) The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2006, 2 Ed. Handbook of Enology vol. 2.
- RIBÉREAU-GAYON P.; PEYNAUD E.; SUDRAUD P. (1982). Science et Techniques du vin. Tome 4. Dunod: Paris.
- SOMERS T.C.; Evans M.E. (1977). Spectral evaluation of young red wine, anthocyanin equilibrium, total phenolic, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 279-287.
- UITSLAG H.; MINH-NGUYEN S.G.; SKURRAY G. (1996). Removal of tartrate from wine by electrodiálisis. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 390, 75-78.

EVALUATION OF THE EVOLUTION OF THE ANTHOCYANINS PROFILE IN RED WINE GRAPES VARIETIES IN ALENTEJO

Maria I. ROUXINOL¹; Joana. VESTIA¹; Helena FERREIRA²; M. Rosário MARTINS¹; Ana E. RATO¹; João M. BARROSO¹

Abstract

The flavonoids (including anthocyanins) are wine compounds with important anti-oxidant activity, protecting the cells against oxidative processes, preventing cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, among others (Antoniolli *et al.* 2015; Castañeda-Ovando *et al.* 2009; Hosu *et al.* 2014; Huang *et al.* 2009; Kong *et al.* 2003).

Anthocyanins in grapes at harvest are determinant to red wine quality and their development in the grape must be characterised in order to determine the most suitable date for the harvest. Thus the aim of this research is the evaluation of anthocyanins composition in two red wine grape varieties from véraison continuing through ripening. Anthocyanins were quantified by high resolution liquid chromatography (HPLC-DAD). Additionally, the total phenols content were quantified by UV-Vis Spectrometry.

The anthocyanins' profile evolution may be dependent on the variety and ripening phase. During ripening grape samples have shown an increase of coumaryl derivatives. This information may lead us to understand the anthocyanins biosynthesis pathway in different grape varieties. The development of anthocyanins from the véraison seems to follow a pattern that coincides with the increasing accumulation of soluble sugars.

Keywords: Anthocyanins, grape ripening, tannins, flavonoids, HPLC-DAD

INTRODUCTION

Anthocyanins are water soluble pigments (De Nisco *et al.* 2013; Oancea & Oprean 2011) responsible for the red colour in grapes and wine and are located primarily in the grape skins' lower epidermis (Jordao & Correia 2012; Lochner 2006; Yan *et al.* 2005). This compounds

are secondary metabolites of plants stored in the vacuole (Oancea & Oprean 2011) and consist in an aromatic ring linked to a heterolothic ring with oxygen in its constitution which is linked to another aromatic ring with a carbon-carbon bond (Castañeda-Ovando *et al.* 2009). The anthocyanin biosynthesis begins with the pentophos-

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

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

pate pathway, goes through the shikimic pathway and ends in the flavonoids pathway. It begins with phenylalanine in which the amine group is eliminated to produce cinnamic acid that will be hydroxylated to p- coumaric acid. The di-hydroflavonoids are converted to flavonoids that will be glycosylated into the respective anthocyanin (Oancea & Oprean 2011; Zhang et al. 2014; Campanella *et al.* 2014). This biosynthesis indicates that anthocyanins are glycosylated derivatives of 3,5,7,3- tetrahydroxylflavilium cation (also known as anthocyanidin) (Jordao & Correia 2012; Lochner 2006). The glycosidic compound increases the chemical stability of anthocyanidin, and the anthocyanins are the majority chemical forms present in grapes and wine. The individual anthocyanins differ in the hydroxyl groups; the type, number and position of the sugars attached to the molecule and number of aliphatic compounds or aromatic compounds linked to the sugar molecule. Anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes are mainly 3-monoglucosides of five aglycones: malvidin, peonidin, petunidin, cyanidin and delphinidin. Malvidin 3- glucoside is the most important anthocyanin quantitatively in grapes and wine. The concentration of anthocyanins of grapes *Vitis vinifera* varies between 0.30 and 0.75 mg/g berry and depends on the variety, season and environment. The average concentration of anthocyanins in red wine made from *Vitis vinifera* is around 150 mg/L (Lochner 2006). Deeper coloured grapes allow the production of deeper coloured red wines with a delightful aroma and better wine quality. Considering the lack of information about the variability of anthocyanins composition in red wine grapes growing in Alentejo, in this research it was evaluated the anthocyanins composition in two red wine grape varieties from véraison continuing through ripening. A faster extraction method was performed and the content of anthocyanins were quantified by HPLC-DAD. Additionally, the content of total phenols were quantified by UV-Vis in order to correlate with anthocyanins profile.

MATERIALS AND METHODS

1. SAMPLES HARVESTING AND PREPARATION

The samples were harvested in different phases of maturation between the véraison and the end of the maturation. The anthocyanins were extracted using acidified ethanol in the

proportion 1:1 during 5 min. The grapes were harvested in 4 known locations (location 1 and 2 to Syrah grapes and location 3 and 4 to Aragonês)

2. HPLC-DAD ANALYSIS

Chromatographic analysis was adapted from Antonioli *et al.*, 2015. The mobile phase used consisted of ultrapure water /formic acid /acetonitrile in the ratio 87/10/3 (v/v/v) (eluent A) and ultrapure water/formic acid/acetonitrile in the ratio 40/10/50 (eluent B). The gradient used was 0-28min 25%B, 28-33min 31%B, 33-38min 40%B, 38-48min 50%B, 48-53min.

100%B, 53-68min 10%B and 68-75min 10%B. The flow of the mobile phase was 0.2 ml/min and the temperature 35°C and injection volume was 10µl. Quantification of the peaks was performed at 520nm and the content of anthocyanin expressed in oenin content (mg/g berry).

3. TOTAL PHENOLIC QUANTIFICATION

To determine the total phenolic content of the samples it was used the Folin-Ciocalteu method (Santi et al. 2014). Pyrogalic acid solutions (0 to 500µg/ml) were used as standard. The samples were analysed in microplate using 234µl of water, 5µl of sample/standard and 15µl of Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min. incubation, 45µl of saturated sodium carbonate solution was added and the absorbance was read at 630nm after incubation of 30 min. at 40°C.

RESULTS AND DISCUSSION

The samples of each variety were collected in 2 different known places in order to compare if there were significant differences between Anthocyanin profiles (Figure 1).

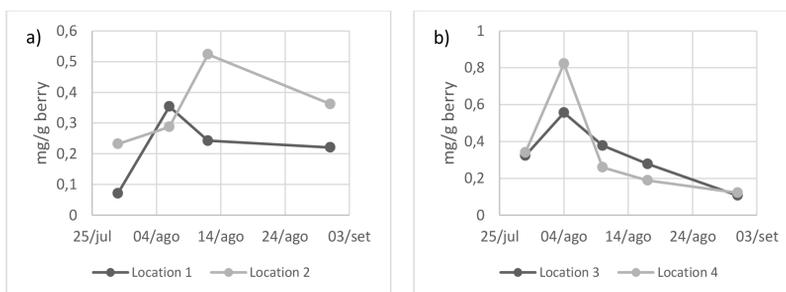


Figure 1. Evolution of total anthocyanin content in Syrah (a) and Aragonês (b) grapes

As shown in Figure 1, it is noticeable that Syrah and Aragonês grapes have maximum values in different dates of the véraison. Aragonês grapes reach the maximum concentration of Anthocyanins content earlier in time and also has a higher drop in their content with the approach of the harvesting time. Between locations in Aragonês, location 4 showed the higher value for anthocyanins concentrations, it is possible that a lack of irrigation should be the origin of those differences. It is also noticeable that Syrah grapes have a really different behaviour according to the location. Grapes that were collected on location 2 present a later maximum anthocyanin content and apparently a lower decrease. It is important to notice that the total of anthocyanins is very low comparing with bibliography due to the extraction time.

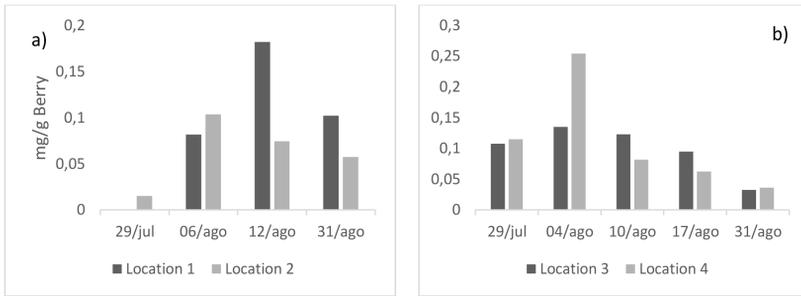


Figure 2. Evolution of Malvidin-3-glucoside Profile in Syrah (a) and Aragonès grapes (b)

The most relevant anthocyanin in *Vitis vinifera* grapes is Malvidin-3-glucoside (Lochner 2006; Jordão & Correia 2012). The profile of the malvidin-3-glucoside evolution (figure 2) is coincident with the evolution of total anthocyanin content (figure 1). Although in Syrah grapes the maximum anthocyanin content on location 1 is reached on 6th August, the maximum Malvidin value was reached on the next harvesting on 12th August. On Aragonès grapes the maximum value of Malvidin-3-glucoside was coincident with the maximum of total anthocyanin content.

Phenolic compounds are associated with sensory qualities such as colour, flavour, astringency, bitterness and hardness of grapes and wine. They are located primarily in grapes' seeds and skins. As expected the evolution of phenolic compounds until harvest is similar to anthocyanins evolution being Syrah the variety with higher values just after véraison (fig.3). The phenolic composition of grapes and wine is influenced by numerous factors including the variety, the location of the vineyard and viticulture practices (Lochner 2006).

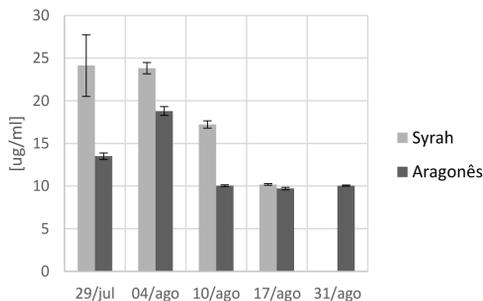


Figure 3. Total phenolic content in Syrah and Aragonès during ripening period (from véraison until harvest)

Many anthocyanins have sugar residues which are acylated with aromatic such as p-coumaric at the C position at the glucose moiety. This acylation promotes chemical stability to the anthocyanins (He et al. 2010). The anthocyanin composition profile presented, at harvest, a higher proportion of monoglucosides in Aragonès contrary to Syrah which reveal a higher proportion of coumaryl derivatives. The anthocyanin composition was evaluated during ripening (data not shown) and it is not possible to identify a pattern according to variety or location.

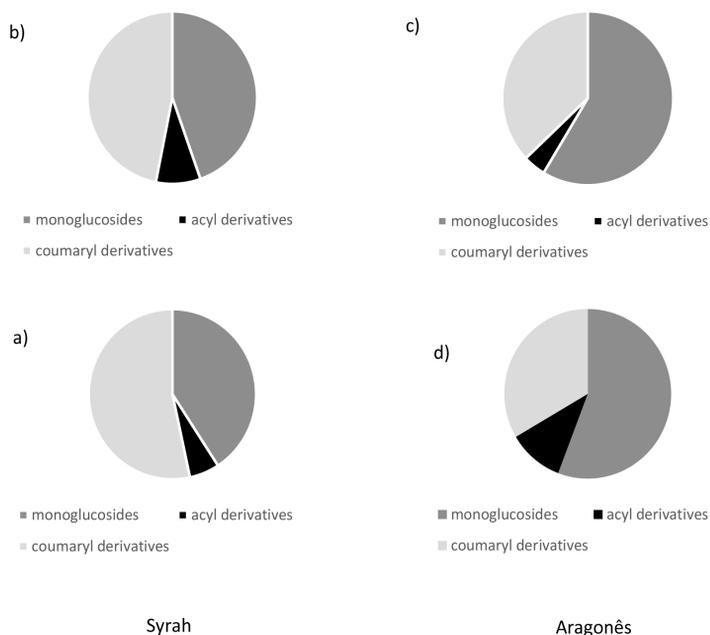


Figure 4. Proportion of different anthocyanin derivatives at 31th of August in Syrah and Aragonès in location 1 (a), location 2 (b), location 3(c) and location 4(d).

CONCLUSION

In this study we were able to notice that the Aragonês variety has a bigger anthocyanins ratio probably due to cultural practices. Also the most prevalent anthocyanin during the ripening process is malvidin-3-glucoside and the anthocyanins with more expression were anthocyanin-3-glucosides.

It is commonly accepted that the anthocyanin profile in each cultivar is a result of the genetic inheritance however other factors such as location can promote a changing in the anthocyanin cultivar's profile. It was not evident a pattern in the anthocyanin profile according to location or variety, however it was possible to identify different amounts of anthocyanins derivatives between Syrah and Aragonês.

BIBLIOGRAPHY

- Antoniolli, A. et al., 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, 178, pp.172–178. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461500093X>.
- Campanella, J.J., Smalley, J. V & Dempsey, M.E., 2014. A phylogenetic examination of the primary anthocyanin production pathway of the Plantae. *Botanical Studies*, 55(1), p.10. Available at: <http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/10>.
- Castañeda-Ovando, A. et al., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), pp.859–871. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- Hosu, A., Cristea, V.-M. & Cimpoi, C., 2014. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry*, 150, pp.113–118. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613016026>.
- Huang, Z. et al., 2009. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), pp.819–824. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.005>.
- Jordão, a. M. & Correia, a. C., 2012. Relationship between antioxidant capacity, proanthocyanidin and anthocyanin content during grape maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz grape varieties. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 33(2), pp.214–224.
- Jordao, A.M. & Correia, A.C., 2012. Relationship Between Antioxidant Capacity , Proanthocyanidin and Anthocyanin Content During Grape Maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz Grape Varieties. , 33(2), pp.214–224.
- Kong, J.M. et al., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), pp.923–933.
- Lochner, E., 2006. *The evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for the determination of total phenolics and total anthocyanins concentrations of grapes by*. Stellenbosch University.
- De Nisco, M. et al., 2013. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). *Food Chemistry*, 140(4), pp.623–629. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.123>.
- Oancea, S. & Oprean, L., 2011. Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits. *Food Technol.*, XV(1), pp.3–16.

- Santi, M.M. et al., 2014. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2), pp.256–261.
- Yan, Y. et al., 2005. Metabolic Engineering of Anthocyanin Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7), pp.3617–3623. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/71/7/3617><http://aem.asm.org/cgi/content/short/71/7/3617><http://aem.asm.org/cgi/reprint/71/7/3617.pdf>.
- Zhang, Y., Butelli, E. & Martin, C., 2014. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19(JUNE 2014), pp.81–90.

EVOLUÇÃO DO PERFIL FENÓLICO DE UM VINHO TINTO CONSERVADO COM ALTERNATIVOS DE MADEIRA DE ACÁCIA E DE CEREJEIRA

Andreia COSTA¹; Fernanda COSME¹; Fernando M. NUNES¹; António M. JORDÃO^{2*}

RESUMO

Novas tendências têm ocorrido através da utilização de madeiras que não de carvalho, para utilização enológica, como seja a madeira de cerejeira e de acácia. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o perfil fenólico durante 65 dias de um vinho tinto conservado com aparas de madeira de acácia e cerejeira. Efetuou-se ainda uma análise comparativa com os resultados obtidos para o mesmo vinho, mas conservado com diferentes aparas de madeira de carvalho. Os resultados obtidos não permitiram evidenciar uma clara diferenciação no perfil fenólico do vinho conservado em contacto com as diferentes aparas de madeira. Porém, o contacto com aparas de madeira de acácia pareceu induzir a uma maior tendência para o vinho apresentar valores significativamente mais elevados em compostos fenólicos não flavonóides e de intensidade da cor. O vinho estagiado em contacto com aparas de acácia, apresentou ainda valores significativamente mais elevados em ácido *trans*-caftárico, ácido coutárico e ácido cafeico, enquanto que o vinho conservado com aparas de cerejeira apresentou no geral, valores significativamente mais elevados de ácido gálglico e de (+)-catequina.

Palavras-chave: alternativos de madeira, acácia, cerejeira, compostos fenólicos, vinho tinto.

1 - INTRODUÇÃO

Considerando a crescente tendência da utilização de aparas de madeira na elaboração e conservação dos vinhos, a União Europeia autorizou em 2005 a utilização de aparas de madeira de carvalho com dimensão superior a 2 mm (Regulamento CE nº2165/2005), seguindo-se a definição das normas de utilização das aparas na elaboração dos vinhos (Regulamento CE nº1507/2006). Assim, atualmente ocorre uma grande diversidade de produtos alternativos de madeira de carvalho que são apresentados sob várias formas, dimensões, níveis de tosta e de diferentes origens botânicas e geográficas (CABRITA *et al.* 2011; JORDÃO *et al.* 2012). Porém, nos últimos anos novas pos-

¹ CQ-VR, Centro de Química de Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, 5001-801 Vila Real, Portugal.

² Instituto Politécnico de Viseu (CI&DETS), Escola Superior Agrária, Estrada de Nelas, Quinta da Alagoa, Ranhados, 3500-606 Viseu, Portugal. *Email: antoniojordao@esav.ipv.pt

sibilidades de utilização de outras madeiras, que não de carvalho, para fins enológicos têm surgido, caso da madeira de cerejeira e de acácia. No entanto, surge a necessidade de se proceder à avaliação do real impacto dessas madeiras nas características dos vinhos, em termos físicos-químicos e sensoriais. Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar o perfil fenólico ao longo do tempo de um vinho tinto conservado com alternativas de madeira de acácia e de cerejeira e ao mesmo tempo efectuar uma análise comparativa com os resultados obtidos para o mesmo vinho conservado com alternativas de madeira de carvalho.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizadas aparas de madeira de carvalho português (*Quercus pyrenaica*), carvalho francês (*Quercus robur*), cerejeira (*Prunus avium*) e acácia (*Robinia pseudoacacia*). A dose de aparas utilizada foi de 3 g/L, tendo todas as aparas de acordo com o fornecedor sido submetidas a uma tosta média. O vinho tinto utilizado foi da colheita de 2014 sendo constituído em partes iguais por 3 castas (Touriga Nacional, Tinta Roriz e Jaen) e conservado em contacto com as diferentes aparas de madeira durante 65 dias.

2.2. Metodologias

Os parâmetros fenólicos avaliados nos vinhos foram: compostos fenólicos totais, fenóis flavonóides e não flavonóides, (KRAMLING e SINGLETON, 1969), antocianinas totais (RIBÉREAU-GAYON e STRONESTREET, 1965), antocianinas coradas, pigmentos totais e poliméricos (SOMERS e EVANS, 1977) e a intensidade da cor (OIV, 2012). Procedeu-se ainda ao estudo da evolução dos teores em antocianinas individuais, (+)-catequina e de alguns ácidos fenólicos por HPLC segundo as condições descritas por GUISE *et al.* (2014).

3 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na figura 1, são apresentados os resultados referentes à evolução dos vários parâmetros fenólicos estudados nos vinhos conservados em contacto com as diferentes aparas de madeira. Os resultados apontam para um aumento dos teores em compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides para a generalidade dos vinhos durante os primeiros 45 dias seguido por um decréscimo generalizado dos valores. No caso dos teores em antocianinas totais e coradas, intensidade da cor e pigmentos totais, a sua evolução foi caracterizada por uma generalizada oscilação dos valores sem uma tendência bem definida. Porém, no que respeita aos valores em pigmentos poliméricos, ocorreu uma ligeira tendência para um aumento dos valores ao longo do tempo de

conservação. Após 65 dias de conservação, os resultados apontam para que os vinhos estagiados em contacto com aparas de madeira de acácia tenham apresentado valores significativamente mais elevados em compostos fenólicos não flavonóides, intensidade da cor e pigmentos poliméricos (embora neste caso, sem significância estatística) relativamente aos restantes.

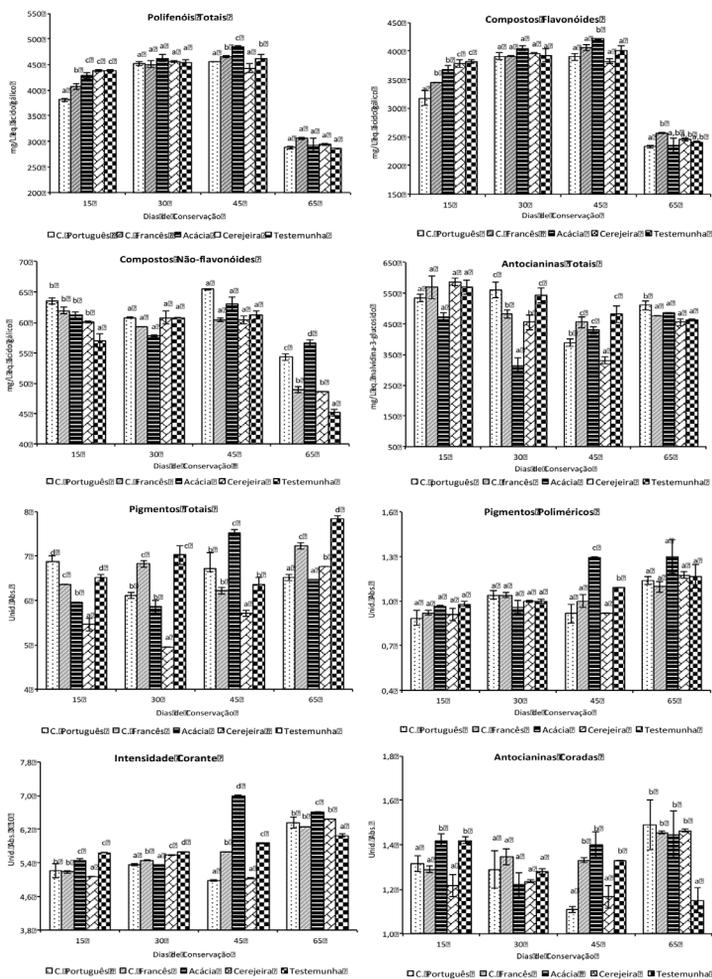


Figura 1 - Evolução de vários parâmetros fenólicos ao longo do tempo nos vinhos conservados em contacto com diferentes aparas de madeira. Valores médios com a mesma letra, para os diferentes vinhos não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O vinho conservado em contacto com as aparas de madeira de cerejeira apresentou o terceiro valor significativamente mais elevado nos teores em pigmentos totais (6.77 u. abs.) seguindo-se por ordem crescente o vinho conservado com aparas de carvalho francês (7.22 u. abs.) e o vinho conservado sem aparas (7.83 u. abs.). Relativamente aos restantes parâmetros, não foi possível verificar uma tendência clara entre o vinho conservado com as aparas de cerejeira comparativamente aos restantes. Provavelmente a utilização de tempos de conservação mais perlongados ou a utilização de diferentes doses de aparas poderão potencialmente contribuir para eventuais diferenças. Neste sentido CHINNICI *et al.* (2014), ao estudarem a evolução de vinhos tintos em barricas de madeira de cerejeira e de carvalho verificaram que só para tempos de conservação mais perlongados (4 meses) foi possível constatar diferenças mais evidentes entre os vinhos.

No que diz respeito à forma como evoluíram os teores das antocianinas monoglucósiladas analisadas (quadro 1), em todos os vinhos essa evolução foi caracterizada no geral por uma oscilação dos valores ao longo do tempo, não ocorrendo uma tendência de evolução clara. Estes resultados, confirmam os resultados já apresentados para os teores em antocianinas totais apresentados na figura 1.

Quadro 1 - Evolução dos teores de algumas antocianinas monoglucósiladas (mg/L) ao longo do tempo nos vinhos conservados em contacto com diferentes aparas de madeira.

Antocianinas monogluc.	Dias de conservação															
	15 dias				30 dias				65 dias							
	CP	CF	AC	CE	T	CP	CF	AC	CE	T	CP	CF	AC	CE	T	
Delfinidina-3-monogluc.	1.92± 0.52 ^b	2.44± 0.07 ^a	1.85± 0.14 ^b	1.00± 0.09 ^a	1.75± 0.14 ^b	1.98± 0.04 ^a	1.55± 0.26 ^b	1.50± 0.19 ^b	0.73± 0.03 ^a	1.63± 0.16 ^b	5.17± 0.01 ^b	5.46± 0.02 ^b	2.84± 0.16 ^a	5.16± 0.26 ^b	4.95± 0.14 ^b	
Cianidina-3-monogluc.	0.87± 0.71 ^a	1.25± 0.24 ^a	1.95± 0.82 ^b	2.62± 0.27 ^c	n.d.	0.78± 0.08 ^a	1.23± 0.41 ^b	1.82± 0.07 ^c	1.26± 0.19 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1.00± 0.08 ^a	1.51± 0.13 ^b	n.d.	
Petunidina-3-monogluc.	3.82± 0.11 ^a	4.28± 0.59 ^b	3.65± 0.12 ^a	4.13± 0.58 ^b	4.54± 0.67 ^b	3.25± 0.03 ^c	3.04± 0.37 ^b	3.73± 0.40 ^b	2.67± 0.27 ^a	3.10± 0.32 ^c	7.76± 0.12 ^c	6.96± 0.58 ^b	7.13± 0.67 ^b	7.61± 0.03 ^c	6.05± 0.37 ^a	
Peonidina-3-monogluc.	7.21± 0.42 ^c	9.02± 1.20 ^d	6.75± 2.67 ^b	6.42± 0.19 ^b	5.96± 1.60 ^a	5.98± 0.03 ^a	5.84± 0.07 ^b	4.98± 0.53 ^a	5.04± 0.23 ^a	5.62± 2.29 ^b	10.4± 0.2 ^b	9.88± 0.42 ^a	10.0± 0.02 ^a	10.4± 0.34 ^b	9.91± 0.71 ^a	
Malvidina-3-monogluc.	20.2± 0.1 ^b	21.0± 1.7 ^a	20.3± 0.4 ^a	19.5± 0.3 ^a	19.5± 0.4 ^a	18.3± 1.7 ^a	15.6± 0.6 ^b	17.2± 1.2 ^a	15.4± 0.5 ^a	17.9± 0.5 ^a	35.8± 0.6 ^b	37.2± 2.4 ^b	37.5± 2.9 ^b	39.6± 0.4 ^a	36.5± 2.9 ^a	

CP - Vinho com aparas de Carvalho Português; CF - Vinho com aparas de Carvalho Francês; AC - Vinho com aparas de Acácia; CE - Vinho com aparas de Cerejeira; T - Vinho sem aparas. Valores expressos em mg/L de equivalentes de malvidina-3-monoglucósido; Valores médios com a mesma letra para cada tempo de conservação e para os diferentes vinhos não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Porem, no caso da cianidina-3-monoglucósido, verificou-se a tendência para um decréscimo dos seus valores ao longo do tempo em todos os vinhos. Vários autores (PÉREZ-PRIETO *et al.* 2003; MATEJÍCEK *et al.* 2005; DE CONINCK *et al.* 2006), têm descrito a tendência para um decréscimo dos teores em antocianinas ao longo do tempo durante a conservação dos vinhos, incluindo nos vinhos conservados em contacto com aparas de madeira de carvalho. Este decréscimo resulta de uma conjunto de fatores como sejam, reações de condensação e de polimerização, precipitação

destes pigmentos e ainda no caso dos vinhos conservados em contacto com a madeira da ocorrência de reações entre as antocianinas e os componentes fenólicos extraídos da madeira (JORDÃO *et al.* 2008). De considerar que a tendência verificada neste trabalho não traduz a evolução acima apresentada, o que poderá ser devido ao tempo de conservação considerado (65 dias) e como tal não ter sido suficiente para se poder verificar a existência de uma clara tendência de evolução dos valores.

No que diz respeito ao potencial impacto do contacto dos vinhos com as diferentes aparas de madeira, tal como ocorreu para os teores em antocianinas totais, não se verificou um efeito diferenciador do potencial impacto das diferentes madeiras nos vinhos, embora o vinho testemunha, após 65 dias de conservação tenha apresentado no geral uma ligeira tendência para apresentar valores significativamente mais baixos das diferentes antocianinas monoglucósiladas analisadas. Recentemente GOMEZ-GALLEGO *et al.* (2015), em vinhos tintos vinificados com aparas de carvalho francês e americano constataram também a existência de pequenas diferenças ao nível dos teores em antocianinas individuais entre os vinhos a quando do seu engarrafamento.

A evolução dos teores em (+)-catequina e de alguns ácidos fenólicos são apresentados no quadro 2. Para todos os vinhos verificou-se um decréscimo dos teores de ácido gálgico ao longo do tempo de conservação. Relativamente ao potencial efeito das diferentes aparas nos teores de ácido gálgico, os vinhos estagiados com aparas apresentaram no geral valores mais elevados deste composto, sendo que após 65 dias de conservação, os vinhos conservados com aparas de cerejeira apresentaram valores significativamente mais elevados (13.4 mg/L), seguido do vinho conservado com aparas de carvalho português (10.3 mg/L). Estes resultados poderão ser resultado de valores mais elevados deste composto presente nas madeiras referidas e como tal existir um maior potencial de extração de ácido gálgico para os vinhos. No caso dos teores em (+)-catequina, constatou-se que após 65 dias de conservação, foi também o vinho conservado com aparas de cerejeira o que apresentou valores significativamente mais elevados (0.93 mg/L). Segundo os resultados obtidos por CHINNICI *et al.* (2014) em extratos de madeira de cerejeira, os flavanóis e as procianidinas são a principal classe de compostos químicos presentes neste tipo de madeira, atingido um valor de cerca de 0.9 mg/g de madeira, sendo um factor diferenciador desta madeira relativamente às madeiras de carvalho. Ainda de acordo com estes autores, a (+)-catequina e os seus dímeros representam cerca de 90% do total de flavanóis presentes nesta madeira.

Quadro 2 - Evolução dos teores de (+)-catequina e de alguns ácidos fenólicos (mg/L) ao longo do tempo nos vinhos conservados em contacto com diferentes aparas de madeira.

Compostos fenólicos	Dias de conservação														
	15 dias					30 dias				65 dias					
	CP	CF	AC	CE	T	CP	CF	AC	CE	T	CP	CF	AC	CE	T
Ácido gálico	26.1± 0.4 ^a	35.1± 0.4 ^b	34.5± 0.3 ^b	35.4± 0.9 ^b	26.9± 0.1 ^a	26.5± 0.5 ^a	35.1± 0.9 ^b	34.1± 1.4 ^b	34.1± 0.7 ^b	29.1± 0.4 ^a	10.3± 0.27 ^a	5.0± 0.6 ^a	5.9± 0.5 ^a	13.4± 0.4 ^d	9.3± 0.9 ^b
(+)-Catequina	1.85± 0.63 ^c	1.85± 0.09 ^c	1.63± 0.09 ^b	1.35± 0.43 ^a	1.26± 0.61 ^a	0.79± 0.26 ^a	0.87± 0.68 ^a	0.84± 0.89 ^a	0.66± 0.59 ^a	1.14± 0.14 ^b	0.63± 0.31 ^b	0.47± 0.22 ^a	0.62± 0.26 ^b	0.93± 0.31 ^a	0.71± 0.14 ^a
Ácido trans-caftárico ⁽¹⁾	0.02± 0.01 ^a	0.04± 0.01 ^a	1.53± 0.05 ^b	0.05± 0.02 ^a	0.02± 0.01 ^a	0.09± 0.02 ^a	0.18± 0.05 ^b	2.02± 0.44 ^c	0.10± 0.06 ^a	0.05± 0.03 ^a	0.12± 0.06 ^b	0.29± 0.30 ^d	2.54± 0.36 ^c	0.16± 0.06 ^c	0.07± 0.01 ^a
Ácido coutárico ⁽²⁾	1.82± 0.43 ^a	2.44± 0.91 ^b	2.89± 0.16 ^c	2.24± 0.83 ^b	2.58± 0.02 ^b	1.76± 0.33 ^a	2.29± 0.03 ^b	2.45± 0.16 ^b	1.90± 0.06 ^a	2.24± 0.09 ^b	1.45± 0.04 ^a	2.06± 0.19 ^b	2.84± 0.49 ^b	1.34± 0.16 ^c	1.55± 0.26 ^c
Ácido cafeico	0.20± 0.05 ^a	0.34± 0.20 ^c	0.78± 0.53 ^a	0.29± 0.16 ^b	0.59± 0.31 ^d	0.21± 0.19 ^a	0.33± 0.05 ^c	0.76± 0.05 ^c	0.26± 0.04 ^b	0.44± 0.27 ^d	0.17± 0.06 ^b	0.10± 0.08 ^a	0.68± 0.12 ^d	0.15± 0.08 ^b	0.24± 0.07 ^c
Ácido ferúlico	0.11± 0.02 ^a	0.16± 0.01 ^b	0.57± 0.07 ^c	0.61± 0.09 ^c	0.63± 0.05 ^c	0.10± 0.06 ^a	0.13± 0.07 ^a	0.43± 0.03 ^b	0.47± 0.14 ^b	0.47± 0.03 ^b	0.09± 0.03 ^a	0.10± 0.05 ^a	0.33± 0.02 ^b	0.31± 0.14 ^d	0.30± 0.02 ^b
Etil-cafeico ⁽¹⁾	0.06± 0.02 ^b	0.07± 0.01 ^b	0.11± 0.07 ^c	0.10± 0.09 ^c	0.04± 0.02 ^a	0.05± 0.05 ^b	0.07± 0.06 ^b	0.11± 0.07 ^c	0.10± 0.03 ^a	0.03± 0.01 ^a	0.02± 0.01 ^a	0.04± 0.03 ^a	0.05± 0.03 ^a	0.04± 0.02 ^a	0.01± 0.01 ^a
Etil-coumárico ⁽²⁾	0.12± 0.04 ^a	0.12± 0.08 ^a	0.12± 0.05 ^a	0.12± 0.07 ^a	0.15± 0.02 ^b	0.13± 0.04 ^a	0.12± 0.09 ^a	0.12± 0.05 ^a	0.14± 0.03 ^b	0.15± 0.06 ^c	0.10± 0.01 ^b	0.12± 0.01 ^b	0.03± 0.01 ^a	0.13± 0.02 ^b	0.13± 0.05 ^b

CP - Vinho com aparas de Carvalho Português; CF - Vinho com aparas de Carvalho Francês; AC - Vinho com aparas de Acácia; CE - Vinho com aparas de Cerejeira; T - Vinho sem aparas. ⁽¹⁾ mg/L de equivalentes de ácido cafeico; ⁽²⁾ mg/L de equivalentes de ácido 4-hidrocinâmico; Valores médios com a mesma letra para cada tempo de conservação e para os diferentes vinhos não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

No que diz respeito à maioria dos ácidos fenólicos analisados (ácido coutárico, ferúlico, etil-cafeico e etil-coumárico), também foi possível constatar um decréscimo dos valores em todos os vinhos ao longo do tempo de conservação considerado. Esta tendência, confirma anteriores resultados obtidos por outros autores em vinhos tintos conservados em barricas de madeira de carvalho e de cerejeira (CHINNICI *et al.* 2014). De salientar que FERNANDEZ DE SIMON *et al.* (2014) referem um decréscimo mais acentuado dos teores em ácido caftárico e coutárico em vinhos conservados em barricas de cerejeira comparativamente ao verificado com o uso de barricas de madeira de carvalho.

No caso do ácido *trans*-caftárico, verificou-se que nos vinhos conservados em contacto com as aparas de madeira ocorreu uma tendência para um aumento dos seus valores, enquanto que para o vinho testemunha, os valores se mantiveram estáveis. Saliente-se que diversos estudos têm apresentado resultados opostos, isto é alguns estudos referem um contínuo decréscimo dos valores (CHINNICI *et al.* 2014; FERNANDEZ DE SIMON *et al.* 2014), enquanto que outros trabalhos referem um aumento dos teores de alguns ácidos cinâmicos durante o envelhecimento dos vinhos (GINJOM *et al.* 2011). Torna-se importante considerar que a evolução dos compostos fenólicos nos vinhos, nomeadamente dos ácidos fenólicos não é linear, dependendo de vários factores, como seja, o tipo de madeira utilizada, o tipo de casta e sua origem usada na elaboração dos vinhos, temperatura à qual o vinho se encontra, as reações de hidrólise que alguns destes compostos sofrem e ainda a sua participação em reações de oxidação (GUTIÉRREZ *et al.* 2005; OLIVEIRA *et al.* 2011; SANZ *et al.* 2012).

Por último, relativamente ao potencial impacto das diferentes aparas de madeiras na evolução dos teores dos diferentes ácidos fenólicos estudados, os vinhos estagiados em contacto com aparas de madeira de acácia, apresentaram valores significativamente mais elevados nos teores em ácido *trans*-caftárico, ácido coutárico e ácido cafeico ao longo do tempo de conservação considerado. Após 65 dias de conservação, o vinho conservado com aparas de acácia apresentou para estes compostos concentrações de 2.54 mg/L para o ácido *trans*-caftárico, 2.84 mg/L para o ácido coutárico e 0.68 mg/L para o ácido cafeico, enquanto que para os restantes vinhos os valores variaram entre 0.12 e 0.29 mg/L (ácido *trans*-caftárico), 1.34 e 20.06 mg/L (ácido coutárico) e 0.10-0.17 mg/L (ácido coutárico). Provavelmente esta diferenciação poderá ser uma eventual característica dos vinhos conservados em contacto com madeiras de acácia. Porém, estes resultados deverão ser considerados como preliminares, devendo ser objeto de aprofundamento, nomeadamente, entre outros aspetos, através de uma prévia caracterização do perfil fenólico das diferentes madeiras, nomeadamente as madeiras de cerejeira e de acácia e ainda a utilização de diferentes doses de aparas a utilizar e tempos de contacto mais prolongados.

4 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos não foram totalmente conclusivos relativamente ao potencial impacto da aplicação de aparas de madeira de cerejeira e de acácia na evolução do perfil fenólico dos vinhos tintos. No entanto os resultados indicam pelo menos que em termos fenólicos, o impacto da aplicação destas novas madeiras não se traduz numa desvalorização qualitativa dos vinhos. Assim, ocorre a necessidade de aprofundamento destes trabalhos, sendo a avaliação sensorial um aspecto essencial no âmbito do potencial efeito destas novas madeiras nas características qualitativas dos vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRITA, M.J., DIAS, C.B., FREITAS, A.M.C. (2011). Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. French oaks. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32:204-210.
- CHINNICI, F., NATALI, N., BELLACHIOMA, A., VERSARI, A., RIPONI, C. (2014). Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT - Food Sci. Technol.* 60:977-984.
- DE CONINCK, G., JORDÃO, A.M., RICARDO-DA-SILVA, J.M., LAUREANO, O. (2006). Evolution of phenolic composition and sensory properties in red wine aged in contact with Portuguese and French oak wood chips. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 40:25-34.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., SANZ, M., CADAHÍA, E., MARTÍNEZ, J., ESTERUELAS, E., MUÑOZ, A.M. (2014). Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chem.* 143:66-76.
- GINJOM, I., D'ARCY, B., CAFFIN, N., GIDLEY, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chem.* 125:823-834.
- GÓMEZ-GALLEGO, M.A., SANCHEZ-PALOMO, E., HERMOSIN-GUTIÉRREZ, I., GONZÁ-

- LEZ VIÑAS, M.A. (2015). Effect of oak chip addition at different winemaking stages on phenolic composition of Moravia Agría red wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 36:21-31.
- GUISE, R., FILIPE-RIBEIRO, L., NASCIMENTO, D., BESSA, O., NUNES, F.M., COSME, F. (2014). Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chem.* 156:250-257.
- GUTIÉRREZ, I.H., LORENZO, E.S.-P., ESPINOSA, A.V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, cabernet sauvignon, cencibel, and syrah. *Food Chem.* 92:69-283.
- JORDÃO, A.M., RICARDO-DA-SILVA, J.M., LAUREANO, O., MULLEN, W., ALAN, C. (2008). Effect of ellagitannins, ellagic acid and some volatile compounds from oak wood on the (+)-catechin, procyanidin B1 and malvidin-3-glucoside content of model wine solutions. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14:260-270.
- JORDÃO, A.M., CORREIA, A.C., DEL CAMPO, R., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L. (2012). Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* 235:817-825.
- KRAMLING, T.E., SINGLETON, V.L. (1969). An estimate of the non flavonoid phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 20:86-92.
- MATEJČEK, D., MIKES, O., KLEJDUS, B., STERBOVA, D., KUBÁN, V. (2005). Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Food Chem.* 90:791-800.
- OIV (2012). International methods of analysis of wines and musts. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Vol. 2. Édition officielle. Paris.
- OLIVEIRA, C.M., FERREIRA, A.C.S., DE FREITAS, V., SILVA, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* 44:1115-1126.
- PÉREZ-PRÍETO, L.J., HERA-ORTS, M.L., LÓPEZ-ROCA, J.M., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I., GÓMEZ-PLAZA, E. (2003). Oak-matured wines: influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 83:1445-1450.
- RIBÉREAU-GAYON, P., STRONESTREET, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* 9:2649-2652.
- SANZ, M., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., CADAHIA, E., ESTERUELAS, E., MUÑOZ, A.M., TERESA HERNÁNDEZ, M., *et al.* (2012). Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Anal. Chim. Acta* 732:33-45.
- SOMERS, T.C., EVANS, M.E. (1977). Spectral evaluation of young red wine, anthocyanin equilibrium, total phenolic, free and molecular SO₂. *J. Sci. Food Agric.* 28:279-287.

IDENTIFICATION OF CAFFEIC ACID AS THE MAJOR COMPOUND PRESENT IN MOSCATEL WINE PROTEIN HAZE HYDROLYSATE

Ricardo CHAGAS^{1,2*}; Ana Maria LOURENÇO¹; Sara MONTEIRO²; Ricardo B. FERREIRA³ Luísa M. FERREIRA¹

ABSTRACT

Proteins play a significant role in the colloidal stability and clarity of white wines (Sauvage, et al., 2010). However, under conditions of high temperatures during storage or transportation, the proteins can self-aggregate into light-dispersing particles causing the so-called protein haze (Waters, et al., 1992). Formation of these unattractive precipitates in bottled wine is a common defect of commercial wines, making them unacceptable for sale (Tabilo-Munizaga, et al., 2014).

Previous studies identified the presence of phenolic compounds in the natural precipitate of white wine (Esteruelas, et al., 2011), contributing to the hypothesis that these compounds may be involved in the mechanism of protein haze formation. The objective of this study was to isolate and identify the compounds contained in induced wine protein haze precipitate after alkaline hydrolysis.

Keywords - protein haze, wine, caffeic acid, caftaric acid, protein

The heat-induced protein precipitate from five liters of white Moscatel of Alexandria wine was subjected to alkaline hydrolysis in 2 M NaOH, 10 mM EDTA and 1% (w/v) L-ascorbic acid following a protocol described elsewhere (Nardini, et al., 2002) with some modifications.

The hydrolyzed sample was subjected to liquid-liquid extraction with ethyl acetate and evaporated to dryness. The extract was further fractionated using reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector (RP-HPLC-DAD) (Figure 1).

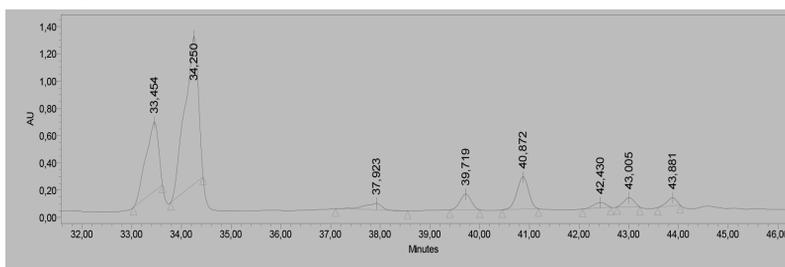


Figure 1 - Chromatogram of the extract obtained after alkaline hydrolysis monitored at 320 nm. Peaks identified in red are the compounds isolated for identification.

The major compound present was found to be caffeic acid amongst other minor, unidentified compounds. Caffeic acid was identified by UV-vis spectra and the structure validated by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) (Figure 2).

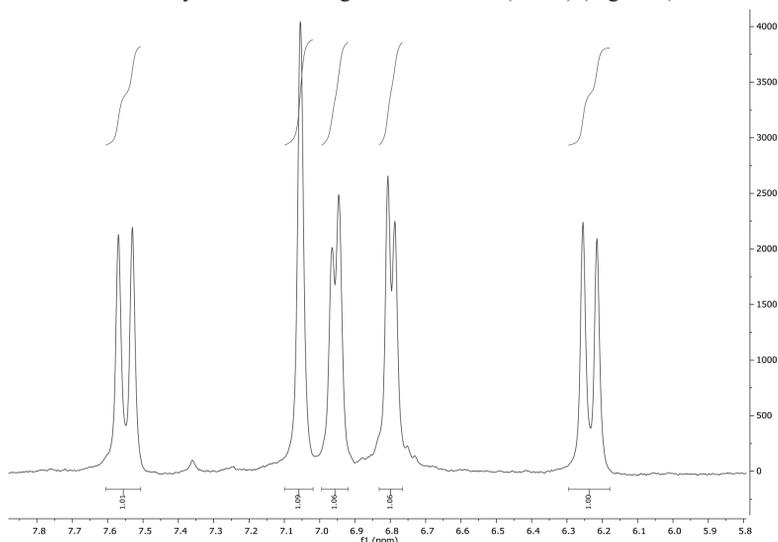


Figure 2 - ^1H NMR spectrum in CD_3OD of caffeic acid isolated from the ethyl acetate fraction of the wine protein precipitate after alkaline hydrolysis.

This work corroborates the observation that phenolic compounds, caffeic acid in particular, may participate in wine protein haze formation since it is the major compound bound to the precipitated proteins. After testing isolated wine proteins with caffeic acid in wine model solution, no differences were registered after heat stress (Figure 3).

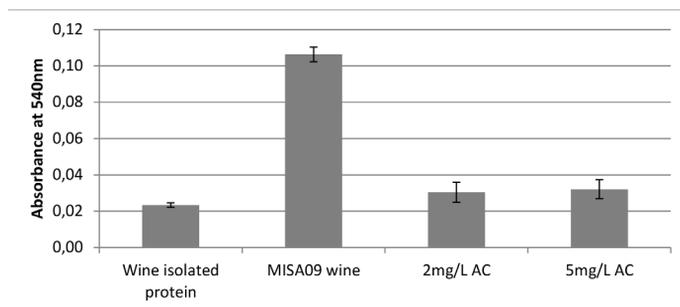


Figure 3 – Changes in turbidity of wine and wine model solutions measured after heat stability test. AC – Caffeic acid, MISA09 – Moscatel of Alexandria wine from 2009 vintage, Instituto Superior de Agronomia.

CONCLUSIONS

- After analysing the composition of a heat-treated wine sediment, the major, non-protein compound found was caffeic acid.
- Caffeic acid was previously identified in the composition of natural precipitate of white wine but was not associated with heat precipitated wine proteins.
- Caffeic acid is not the main causal inducer of white wine protein haze but it may interact with wine proteins by hydrophobic interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

National NMR Facility, supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (RECI/BBB-BQB/0230/2012) and Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support under the Ph.D. Grant SFRH/BD/84749/2012.

REFERENCES

- Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Gil, M., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine. *Food Research International*, *44*, 77-83.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5735-5741.
- Sauvage, F. X., Bach, B., Moutounet, M., & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, *118*, 26-34.
- Tabilo-Munizaga, G., Gordon, T. A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Perez-Won, M., & Acuna, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, *155*, 214-220.
- Waters, E. J., Wallace, W., & Williams, P. J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 1514-1519.

MEJORA DE LOS PARÁMETROS CROMÁTICOS DE VINOS CV. TEMPRANILLO MEDIANTE EL MEZCLADO DE UVAS EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN.

M. Esperanza VALDÉS¹; Samuel FRUTOS¹; Inmaculada TALAVERANO¹; Daniel MORENO¹.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue reducir el contenido alcohólico de vinos elaborados a partir de uvas de la variedad cv. Tempranillo. Los vinos se elaboraron en la campaña 2015 a partir de uvas cosechadas en diferentes estados de maduración: 11 de Agosto con 21^o Brix y 28 de Septiembre con 25^o Brix. Con las uvas de la primera cosecha se elaboró un mosto que fue guardado en frío (2 °C). Las uvas procedentes de la segunda vendimia, previamente despalladas y estrujadas, fueron introducidas en depósitos de acero inoxidable de 50 L. Tras la maceración pre-fermentativa en frío (24 horas), se sangraron los depósitos y el 50

% (M1) y el 70 % (M2) del mosto fue respectivamente reemplazado por el mismo porcentaje del mosto de la primera cosecha. Además, se elaboró un vino testigo (T) únicamente con uvas procedentes de la segunda cosecha.

El grado alcohólico de los vinos M1 y M2 fue menor que el del vino T. Además, los vinos mostraron diferencias en el pH, de modo que: T>M1>M2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la composición fenólica ni en los parámetros cromáticos. Estos resultados muestran que la mezcla de uvas procedentes de diferentes cosechas podría ser una buena opción para evitar la asincronía entre la maduración tecnológica y fenólica en ciertas zonas de cultivo de vid de clima cálido.

Palabras clave: grado alcohólico; pH; acidez; color, polifenoles.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo numerosas investigaciones cuyos resultados indican que uno de los principales problemas con los que se encuentra la viticultura extremeña es el desfase temporal existente

¹ Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura. Ctra. Cáceres s/n, Finca Santa Engracia, 06071 Badajoz, España. E-mail: esperanza.valdes@gobex.es.

en nuestros viñedos entre la madurez del hollejo (parte de la uva donde se sitúan los compuestos responsables del color, astringencia, y aroma) y la de la pulpa (zona en la que se sitúan los azúcares que se transformarán en alcohol, y los ácidos) [Valdés *et al.* (2009); Guerra *et al.* (2010 a y b)]. De modo que el momento óptimo para vendimiar en función del contenido de azúcares y ácidos ocurre en fechas diferentes al de los antocianos (compuestos responsables del color) y taninos (astringencia).

Ante esta situación, que es generalizada en muchas zonas vitivinícolas de climatología semejante a la nuestra, se están buscando soluciones que hasta ahora se han planteado principalmente desde el punto de vista tecnológico. Otro tipo de estrategia, no abordada hasta ahora en nuestra región, es el de actuar a nivel vitivinícola. La alternativa es fermentar mostos de menor contenido en azúcares, y más equilibrados. Para ello, se trata de obtener el mosto procedente de las uvas eliminadas mediante la operación de aclareo de racimos, (este mosto tendrá poco contenido azucarado, baja concentración de sustancias fenólicas y buena acidez), conservarlo y vinificarlo conjuntamente con el mosto procedente de uvas maduras fenólicamente hablando (que aunque escasa acidez, tendrán gran contenido azucarado y buena dotación fenólica). El fundamento de esta técnica, denominada de la *doble vendimia* se basa en fermentar un hollejo totalmente maduro con una pulpa insuficientemente madura. Investigaciones y ensayos efectuados por Balda y Martínez de Toda (2010), indican que es posible disminuir entre un 15 y un 20 % el grado alcohólico de los vinos con esta técnica, sin afectar negativamente a su composición química ni a su calidad sensorial. Además, se trata de un proceso natural, en el que se utilizan únicamente los recursos del propio viñedo, por lo que puede expresar todas sus características propias (terruño, personalidad), sin necesidad de recurrir a tecnologías nuevas, caras, poco conocidas y menos respetuosas con el vino. Este estudio pretende responder a dos de los problemas que tiene actualmente planteados el sector vitícola extremeño: la determinación de la madurez fenólica en diferentes zonas extremeñas y la elaboración de vinos de menor grado alcohólico. Ambas preocupaciones han sido ampliamente expresadas y demandadas en diferentes foros por bodegueros, viticultores y asociaciones relacionadas con la viña y el vino extremeños al equipo investigador de este proyecto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 - Seguimiento de maduración

A fin de determinar las fechas de vendimia, en un viñedo (cv. Tempranillo) perteneciente a CICYTEX, se realizó un seguimiento del ciclo de maduración analizándose los siguientes parámetros: peso de baya, sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, contenido en ácido tartárico y málico, potencial polifenólico total y extraíble, potencial antocianico total y extraíble, taninos totales y extraíbles según la metodología de Gamero *et al.* (2014) y Sarneckis *et al.* (2006).

2.2 - Elaboración de los mostos

Con las uvas de la primera vendimia se obtuvo un mosto según el procedimiento general de obtención de mosto para vinificación en blanco (despalillado-estrujado y leve prensado). El mosto obtenido fue desfogado, sulfitado y conservado en refrigeración (2° C) para poderlo emplear posteriormente hasta el momento de la segunda vendimia

Las uvas de la segunda vendimia fueron únicamente despalilladas y estrujadas y la correspondiente pasta, tras ser homogenizada, se distribuyó en depósitos de acero inoxidable de 50 L.

2.3 - Elaboración de los vinos de doble vendimia

El proceso de elaboración de los vinos se muestra en la Figura 1.

A las 24 horas de encubarse las pastas procedentes de la segunda vendimia, se realizó el sangrado (extracción de líquido de los depósitos). De los distintos depósitos, se extrajeron volúmenes de mosto correspondientes al 0, 50 y 70 % del volumen total de la pasta-mosto del correspondiente depósito. El mismo volumen de mosto extraído fue reemplazado por el mosto procedente de la primera vendimia, de modo que se vinificaron los siguientes tratamientos:

- T (*Testigo*): Pasta procedente de la 2ª vendimia y mosto obtenido de la segunda vendimia.
- M1 (*Mezcla 1*): Pasta procedente de la 2ª vendimia y mosto mezcla (50 % mosto de la primera vendimia y 50 % mosto de la segunda vendimia).
- M2 (*Mezcla 2*): Pasta procedente de la 2ª vendimia y mosto mezcla (70 % mosto de la primera vendimia y 30 % mosto de la segunda vendimia).

Las mezclas pastas-mostos resultantes fueron sulfitadas, homogeneizadas de nuevo e inoculadas con levaduras seleccionadas (Viniferm CR, Agrovin) en dosis de 20 g/hL. No se llevó a cabo ninguna corrección de acidez para no interferir en los resultados analíticos ni se adicionaron otros productos enológicos. La maceración-fermentación tuvo lugar a temperatura controlada (25 °C). Todos los días se procedió a efectuar un remontado, así como el seguimiento de la cinética de fermentación alcohólica mediante el correspondiente descenso de la densidad los primeros días y posteriormente por la medida de azúcares residuales. Una vez finalizada la fermentación (contenido en azúcares residuales menor de 2 g/L) se procedió al descube de los diferentes depósitos, obteniéndose los correspondientes vinos yema.

Cada tratamiento se efectuó por triplicado tal y como refleja la Figura 1

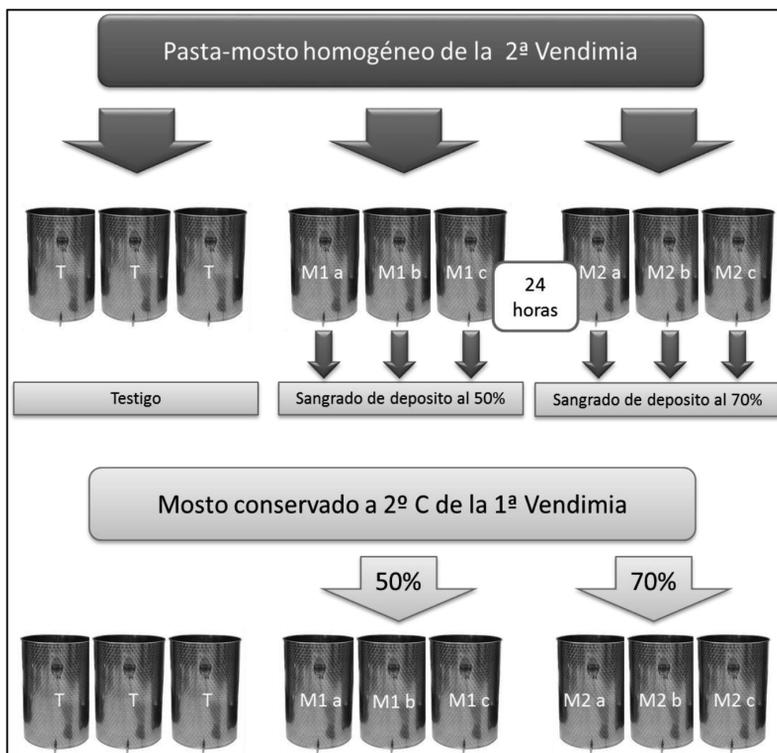


Figura 1 - Proceso de elaboración del vino realizado a partir del mosto de la primera vendimia conjuntamente con pasta obtenida en la segunda vendimia.

2.4 - Análisis de los vinos

En los mostos y vinos se analizaron los correspondientes parámetros generales (densidad, sólidos solubles totales, grado alcohólico probable, grado alcohólico, pH, acidez titulable), según las recomendaciones de la OIV. El contenido en ácido málico y tartárico, en un multianalizador EasyChem [Valdés *et al.* (2009)], parámetros fenólicos (Fenoles totales, antocianos y taninos) y cromáticos según las metodologías propuestas por Ribereau Gayón *et al.* (2000) y los parámetros CIELAB según Heredia *et al.* (2004).

3. RESULTADOS

3.1 - Características físico-químicas de las uvas y los mostos procedentes de las diferentes vendimias

Las Tablas 1a muestra la caracterización físico-química de las uvas procedentes de la primera y segunda vendimia y la Tabla 1b la de los correspondientes mostos.

Tabla 1a. Caracterización físico-química de las bayas procedentes de las dos vendimias.

Madurez tecnológica de la baya		
Parámetro	1ª Vendimia (11-8-2015)	2ª Vendimia (28-9-2015)
Peso de baya (g)	2,2	1,7
Sólidos solubles totales (°Brix)	21,6	25,0
pH	3,8	3,9
Acidez titulable (g/L)	5,7	4,6
Ácido málico (g/L)	2,2	1,3
Ácido tartárico (g/L)	6,3	4,7
Madurez fenólica de la baya		
PPT (u.a.)	39,8	64,4
PPEX (u.a.)	22,4	35,3
PAnT (mg Cloruro de malvidina/L)	308,6	527,8
PAnEx (mg Cloruro de malvidina/L)	137,5	254,5
TnT (mg catequina /L)	666	951
TnEx (mg catequina /L)	299	454
Extractabilidad antocianos (%)	55	52
Madurez de las semillas (%)	75	71

Tabla 1b. Caracterización físico-química de los mostos procedentes de las dos vendimias.

Parámetro	1ª Vendimia (11-8-2015)	2ª Vendimia (28-9-2015)
Densidad (g/L)	1078	1102
Sólidos solubles totales (°Brix)	15,72	24,66
Grado alcohólico probable (% v/v)	10,5	14,3
pH	3,49	4,04
Acidez titulable (g A.Tartárico/L)	4,70	5,24
Ácido tartárico (g/L)	3,31	4,52
Ácido málico (g/L)	1,65	1,78
PPT (u.a.)	8,26	42,52
Antocianos (mg Cloruro de Malvidina/L)	0,27	2,05

Es necesario destacar que en el caso del mosto de la primera vendimia, durante el proceso de conservación perdió algo de acidez, puesto que la acidez de las uvas de partida fue 5,7 g ácido tartárico/L.

3.2 - Caracterización físico-química de los mostos mezcla

La Tabla 2 muestra la composición de los mostos T, M1 y M2 inmediatamente después de ser obtenidos y antes de comenzar a fermentar. T (mosto testigo) presentó el mayor grado alcohólico probable, pH, contenido en polifenoles totales, antocianos e índice de color. Por otro lado, entre los tratamientos M1 y M2 únicamente se hallaron diferencias estadísticas en el °Brix presentando M2 (tratamiento con mayor porcentaje de mosto de la primera vendimia) el menor valor.

Tabla 2 - Caracterización físico-química de los mostos de partida.

Parámetros generales	Tratamiento		
	T	M1	M2
Densidad (g/L)	1102^a	1094^b	1089^b
Sólidos solubles totales (°Brix)	24,66^a	21,63^b	20,05^c
Grado alcohólico probable	14,6^a	12,5^b	11,9^c
pH	4,04 ^a	3,87 ^b	3,78 ^b
Acidez titulable (g/L)	5,24 ^a	4,82 ^a	4,84 ^a
Ácido tartárico (g/L)	4,52^a	4,39^{ab}	4,33^b
Ácido málico (g/L)	1,78 ^a	1,59 ^a	1,70 ^a
PPT (u.a)	12,45^a	8,43^b	7,43^b
Antocianos (mg cloruro de malvidina/L)	42,51^a	24,34^b	23,34^b
Taninos (mg catequina/L)	170,82 ^a	207,74 ^a	175,44 ^a
Parámetros cromáticos	C	M50	M70
Índice de color	2,05^a	1,32^b	1,16^b
Tonalidad color	1,00 ^a	1,04 ^a	1,01 ^a
L	89,22 ^b	92,41 ^a	93,14 ^a
a*	9,95 ^a	6,48 ^b	5,82 ^b
b*	4,86 ^a	3,95 ^a	3,41 ^a
C*	11,22 ^a	7,59 ^b	6,75 ^b
H*	25,94 ^a	31,33 ^a	30,19 ^a
%Amarillo	44,31 ^a	45,60 ^a	44,80 ^a
%Rojo	44,48 ^a	43,82 ^a	44,26 ^a
%Azul	11,21 ^a	10,58 ^a	10,94 ^a

En negrita, parámetros que presentan diferencias significativas

Para el mismo parámetro letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tukey).

3.3. - Caracterización físico-química de los vinos obtenidos

La Tabla 3 muestra la caracterización físico-química de los vinos obtenidos. Tal y como se pretendía, la graduación y el pH de los vinos M50 y M70 fue menor. En ambos casos T>M1>M2. Por otra parte, en lo que respecta a composición fenólica y características cromáticas, las diferencias enológico hablando apenas fueron perceptibles. Por tanto, la tecnología propuesta es una buena alternativa para mejorar la calidad de los vinos procedentes de uvas con problemas de sincronía entre la madurez de la pulpa y el hollejo. Además, es muy importante considerar que el proceso es fácilmente implantable en bodega.

Tabla 3 - Caracterización físico-química de los vinos (fin de fermentación alcohólica).

Parámetros generales	Tratamiento		
	T	M1	M2
Grado alcohólico (% v/v)	14,10^a	13,67^a	12,68^b
Extracto seco (% p/p)	38,90 ^a	32,60 ^a	29,87 ^a
A. Málico (g/L)	1,28 ^a	1,29 ^a	1,23 ^a
A. Tartárico (g/L)	2,30 ^b	2,39 ^b	2,60 ^a
pH	3,94^a	3,87^{ab}	3,82^b
A. Titulable (g ácido tartárico/L)	4,96 ^a	4,72 ^a	4,69 ^a
A. volátil (g ácido acético/L)	0,14 ^a	0,15 ^a	0,16 ^a
Parámetros fenólicos	T	M1	M2
Fenoles totales (mg ácido gálico/L)	1456,11 ^a	1617,67 ^a	1516,34 ^a
Antocianos (mg Cloruro de malvidina/L)	221,00^b	249,52^a	233,59^{ab}
Taninos (mg catequinas/L)	1151,18^b	1227,49^{ab}	1596,21^a
Catequinas (mg/L)	598,56 ^a	749,67 ^a	677,44 ^a
Antocianos copigmentados (%)	40,88^b	44,18^{ab}	45,63^a
Parámetros cromáticos	T	M1	M2
IC	5,45 ^a	5,87 ^a	5,59 ^a
TC	0,69^a	0,65^{ab}	0,63^b
L	74,54 ^a	73,55 ^a	74,73 ^a
a*	30,64 ^a	34,80 ^a	34,43 ^a
b*	-2,67 ^a	-3,11 ^a	-3,40 ^a
C*	30,75 ^a	34,94 ^a	34,59 ^a
H*	175,06 ^a	174,89 ^a	174,35 ^a
% Amarillo	35,38 ^a	34,78 ^{ab}	34,14 ^b
% Rojo	51,45 ^b	53,19 ^{ab}	54,11 ^a
% Azul	13,17 ^a	12,02 ^a	11,74 ^a

En negrita, parámetros que presentan diferencias significativas.

Para el mismo parámetro letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tukey).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gamero, E.; Moreno, D.; Talaverano, I.; Prieto, M. H.; Guerra, M. T. y Valdés, M. E. (2014). Effects of irrigation and cluster thinning on Tempranillo grape and wine composition. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 35(2), 196-204.
- Guerra, M.T.; Moreno, D.; Gamero, E.; Manzano, R.; Uriarte, D.; Mancha, L.; Vidal-Aragón, M.C. y Valdés, M.E. (2010). Estudio de la maduración de los cultivares Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Shiraz en dos campañas de climatología anómala (2003 y 2007) en Tierra de Barros (Extremadura). I Madurez tecnológica. *Enólogos*. Enero-Febrero, 26- 32
- Guerra, M.T.; Moreno, D.; Manzano, R.; Uriarte, D.; Mancha, L.; Vidal-Aragón, M.C. y Valdés, M.E. (2010). Estudio de la maduración de los cultivares Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Shiraz en dos campañas de climatología anómala (2003 y 2007) en Tierra de Barros (Extremadura). II Madurez fenólica. *Enólogos*, Enero-Febrero, 32-36.
- Heredia, F. J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L. y Ramírez, A. (2004). CromaLab, análisis de color, Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04 Sevilla, Spain.
- O.I.V. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et de moûts. Office International de la Vigne et du Vin, Édition Officielle, Juin, Paris (2005).
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudraud P, Ribereau-Gayon P. (1982). *Traité D'Oenologie. Sciences et Techniques du vin. Tome 1. Analyse et contrôle des vins*. Ed Dunod. Paris.
- Sarneckis, C.J.; Smith, P.A.; Dambergs, R. G.; Phillip Jones, Markus J. Herderich, Mercurio; M. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 39-49.
- Valdés, E.; Moreno, D.; Gamero, E.; Uriarte, D.; Prieto, M.H.; Manzano, R.; Picón, J. y Intrigliolo, D. (2009). Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura (Spain). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 43, 67-76.

INFLUÊNCIA DE FATORES CULTURAIS EM PARÂMETROS DE MATURAÇÃO DE UVAS DE DIFERENTES CASTAS NA REGIÃO DE BORBA

Elsa BORRALHO¹; Helena FERREIRA²; Óscar GATO³; João BARROSO⁴

RESUMO

O presente trabalho contempla os resultados das análises de controlo de maturação obtidos na vindima de 2014, em algumas das parcelas da Adega de Borba, em particular na evolução do teor de antocianinas nas castas Touriga Nacional, Syrah e Cabernet Sauvignon durante a maturação. Este estudo teve em consideração diferentes níveis de factores culturais nas parcelas de cultivo, nomeadamente tipo de solo, vigor das plantas e produtividade das mesmas. Os solos mais profundos e férteis são os que apresentam melhores resultados nos parâmetros qualitativos em todas as castas (teores de açúcares e antocianinas mais altos), com maior evidência na casta Syrah. A acumulação de antocianinas e açúcares é mais rápida nas plantas com menor vigor e menor produção. Durante a maturação, as plantas com menor vigor são as que apresentam maior concentração de antocianinas, com excepção da casta Cabernet Sauvignon em solos menos férteis, onde as plantas mais vigorosas e produtivas têm maior concentração de antocianinas.

Palavras-chave: Maturação, Antocianinas, Touriga Nacional, Syrah, Cabernet Sauvignon, Borba

1 INTRODUÇÃO

Há vários anos que a Adega de Borba se disponibiliza a analisar as amostras de controlo de maturação dos seus associados, consciente de que para garantir qualidade nos vinhos é necessária garantir a qualidade da matéria-prima. Em 2006, a Adega adquiriu um equipamento de Espectroscopia por Infravermelho Próximo (NIR), Infra-Xact Foss. Esta tecnologia permite uma análise simples, rápida e mais completa da matéria-prima, com determinação dos parâmetros brix, pH, antocianinas totais (mg/kg) e polifenóis totais a 280 nm (ua/g) (COZZOLINO *et al.*, 2006), os dois últimos permitem-nos conhecer a composição fenólica das uvas.

^{1, 2} e ³ Adega Cooperativa de Borba, C.R.L.; Largo Gago Coutinho e Sacadura Cabral 25 – Ap. 20; 7151-913 Borba, Portugal. E-mail: ¹elsa.borralho@adegaborba.pt; ²helena.ferreira@adegaborba.pt; ³oscar.gato@adegaborba.pt;

⁴ ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal. E-mail: jmmb@uevora.pt

Os compostos fenólicos revestem-se de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados, directa ou indirectamente com a qualidade dos vinhos. São eles os responsáveis pela cor, corpo e adstringência dos vinhos (CABRITA *et al.*, 2003).

Desde então a Adega tem feito vários estudos de evolução e comportamento das diferentes castas e parcelas do seu cadastro de sócios, com o objetivo de conhecer e classificar as parcelas e castas no que respeita à sua evolução e acumulação de antocianinas. Em 2014, a grelha de valorização de pagamento de uvas tintas foi alterada, passando o teor de antocianinas a ser considerado para efeitos de valorização das uvas em determinadas castas, ou seja, os produtores são cada vez mais parte interessada na qualidade dos seus produtos.

O processo de maturação das uvas inclui um conjunto de reacções físicas e bioquímicas, que começa no pintor e acaba com a uva madura, ou seja, quando esta atinge o potencial máximo de cada componente, para ser sujeita a transformações enológicas ou consumo (TOMAZ, 2013).

A partir da fase de pintor ocorre um importante aumento na quantidade de antocianinas presentes na película dos bagos. No entanto a acumulação inicia-se 2 a 3 semanas antes do início do pintor, antes que a coloração seja visível (DARNÉ, 1988 *cit por* TOMAZ, 2013). A evolução do conteúdo de antocianinas é caracterizada por 3 fases (RIBÉREAU-GAYON *et al*, 2006 *cit por* TOMAZ, 2013): primeira fase o nível de antocianinas apresenta um ligeiro aumento, segunda fase em que demonstra um maior crescimento e terceira fase em que se observa uma estabilização seguida de decréscimo até ao fim da maturação tecnológica.

Segundo Guidoni *et al.* (2008) o teor de antocianinas é influenciado por factores genéticos, características do solo, disponibilidade de água, clima (luz e temperatura), práticas agrícolas e presença de vírus nas plantas. Propusemo-nos neste estudo, avaliar a influência de diferentes níveis de vigor e produtividade no processo de maturação das uvas de três castas em diferentes grupos de solos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Para a realização do ensaio, seleccionaram-se as castas Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional de vinhas dos sócios da Adega de Borba.

Para cada casta seleccionámos parcelas de vinha ou partes destas que representassem os diferentes níveis de fatores culturais a que nos propomos estudar:

- três grupos de solos: Grupo E (solos delgados e pobres – Ex, Px), Grupo P (solos profundos e férteis – Pv, Pvc, A) e Grupo V (solos profundos e pouco férteis – Vx, Vcc);
- dois tipos de vigor: plantas pouco e muito vigorosas (Figuras 1 e 2);
- dois tipos de produtividade: baixa (inferior a 1,5kg/planta) e alta produção (superior a 3kg/planta).

As plantas foram classificadas de acordo com as diferentes combinações de vigor e produtividade: plantas A (maior vigor, maior produtividade), plantas B (maior

vigor, menor produtividade), plantas C (menor vigor, maior produtividade) e plantas D (menor vigor, menor produtividade).



Figura 1 - Plantas com pouco Vigor.



Figura 2 - Plantas com muito vigor.

Em estudo tiveram 32 amostras (Tabela 1), das quais foram recolhidas amostras semanalmente desde a primeira semana de Agosto até à vindima das diferentes parcelas (4 a 7 recolhas). Foram recolhidas no total 145 amostras.

Tabela 1 – Identificação e caracterização das amostras em estudo

Id.*	Casta	Tipo de Solo	Grupo Solos	Vigor	Produção	Class.**	Ref.SIG
CEA	Cabernet Sauvignon	Px	Grupo E	V+	P+	A	262/2732
CEB	Cabernet Sauvignon	Px	Grupo E	V+	P-	B	262/2742
CEC	Cabernet Sauvignon	Px	Grupo E	V-	P+	C	262/3478
CED	Cabernet Sauvignon	Px	Grupo E	V-	P-	D	262/3478
CPA	Cabernet Sauvignon	Pv	Grupo P	V+	P+	A	445/2184
CPB	Cabernet Sauvignon	A	Grupo P	V+	P-	B	262/1909
CPC	Cabernet Sauvignon	Pv	Grupo P	V-	P+	C	445/2190
CPD	Cabernet Sauvignon	A	Grupo P	V-	P-	D	262/1909
CVA	Cabernet Sauvignon	Vx	Grupo V	V+	P+	A	554/2501
CVC	Cabernet Sauvignon	Vx	Grupo V	V-	P+	C	554/2501
CVD	Cabernet Sauvignon	Vx	Grupo V	V-	P-	D	554/2501
SEA	Syrah	Px	Grupo E	V+	P+	A	154/2594
SEC	Syrah	Px	Grupo E	V-	P+	C	154/2594
SED	Syrah	Ex	Grupo E	V-	P-	D	61/3064
SPA	Syrah	Pv	Grupo P	V+	P+	A	445/1232
SPC	Syrah	A	Grupo P	V-	P+	C	262/708
SPD	Syrah	A	Grupo P	V-	P-	D	262/708
SVA	Syrah	Vx	Grupo V	V+	P+	A	578/2571
SVB	Syrah	Vx	Grupo V	V+	P-	B	554/2499
SVC	Syrah	Vec	Grupo V	V-	P+	C	288/2581
SVD	Syrah	Vx	Grupo V	V-	P-	D	554/2499
TEA	Touriga Nacional	Px	Grupo E	V+	P+	A	262/2734
TEB	Touriga Nacional	Px	Grupo E	V+	P-	B	154/2592
TEC	Touriga Nacional	Ex	Grupo E	V-	P+	C	61/3063
TED	Touriga Nacional	Px	Grupo E	V-	P-	D	154/2592
TPA	Touriga Nacional	Pv	Grupo P	V+	P+	A	445/1234
TPC	Touriga Nacional	Pv	Grupo P	V-	P+	C	445/1234
TPD	Touriga Nacional	Pv	Grupo P	V-	P-	D	445/1234
TVA	Touriga Nacional	Vec	Grupo V	V+	P+	A	287/767
TVB	Touriga Nacional	Vx	Grupo V	V+	P-	B	554/2500
TVC	Touriga Nacional	Vec	Grupo V	V-	P+	C	287/767
TVD	Touriga Nacional	Vx	Grupo V	V-	P-	D	554/2500

* Id. Amostra: 1ª letra corresponde à casta, 2ª letra ao solo e 3ª letra à classificação de vigor e produtividade.

**Class. - Classificação: A=V+P+; B=V+P-; C=V-P+; D=V-P-.

Os locais de recolha de amostras foram assinalados, de forma a garantir que em todo o ensaio as amostras respeitassem as suas condicionantes culturais.

2.2 Preparação de amostras e análise

As amostras recolhidas eram compostas por cerca de 100 bagos recolhidos aleatoriamente com o pedicelo, tentando-se alternar entre cachos mais ou menos expostos e bagos de diferentes localizações no cacho. Uma vez acondicionadas e identificadas, as amostras foram transportadas para o laboratório da Adega.

Em laboratório, as amostras foram trituradas de forma a obter um preparado homogêneo para análise no NIR InfraXact Foss, sendo os parâmetros em análise: brix, antocianinas totais (mg/g), pH e polifenóis totais a 280 nm (ua/g).

2.3 Tratamento de dados

Na análise da evolução dos parâmetros da maturação, foram definidas em cada casta as linhas de tendência para as diferentes condições culturais em estudo. O tratamento dos dados utilizou o programa Excel 2013.

2.3.1 Análise Estatística

No tratamento dos resultados, das amostras colhidas imediatamente antes da vindima, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento GLM do software estatístico IBM SPSS Statistics (versão 21, 2012) usando a casta e o solo como fatores fixos e o vigor e produção como fatores aleatórios. A separação de média foi efectuada pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Evolução ao longo da Maturação

De acordo com Guidoni *et al.* (2008), um dos factores de variação de concentração das antocianinas é a genética das plantas. Por análise da figura 3 verificamos que as diferentes castas apresentam diferentes níveis de concentração de antocianinas totais no final da maturação. A casta Cabernet Sauvignon atinge teores de antocianinas totais na ordem das 1000 mg/kg, enquanto a Touriga Nacional apresenta concentrações superiores a 1200 mg/kg. A casta Syrah revelou valores de antocianinas totais com cerca de 1.100mg/Kg, apesar de maior dispersão de valores nos diferentes solos.

A casta Cabernet Sauvignon teve melhores resultados qualitativos nos solos V, destacando-se pela maior concentração de antocianinas e açúcares (Figuras 3-3 e 4-3). Nos solos mais férteis (Grupos P e V) as plantas menos vigorosas (C e D) têm maiores concentrações de antocianinas. Contrariamente nos solos E são as plantas A que têm teores mais altos, o que significa que em solos menos férteis o estímulo de vigor poderá ser benéfico para ganhos na concentração de antocianinas (Figura 3-1).

A casta Syrah é casta em estudo que apresenta maior variação face ao tipo de solo, sendo os solos P que apresenta valores mais altos de antocianas e brix (Figuras 3-5 e 4-5). Em todos os solos as plantas D são as que apresentam mais rápida concentração de antocianas e teores finais mais altos, o mesmo acontece em relação ao brix. Nos solos V menor produtividade beneficia a síntese de antocianas (Figura 3-6).

Relativamente à casta Touriga Nacional, os comportamentos das diferentes condicionantes culturais são semelhantes nos solos E e P (Figuras 3-7 e 4-8). Nos solos V, a resposta da casta nas diferentes condicionantes é mais evidente, sendo as plantas com maior produção (A e C) que têm mais rápida acumulação de antocianas (Figura 3-9).

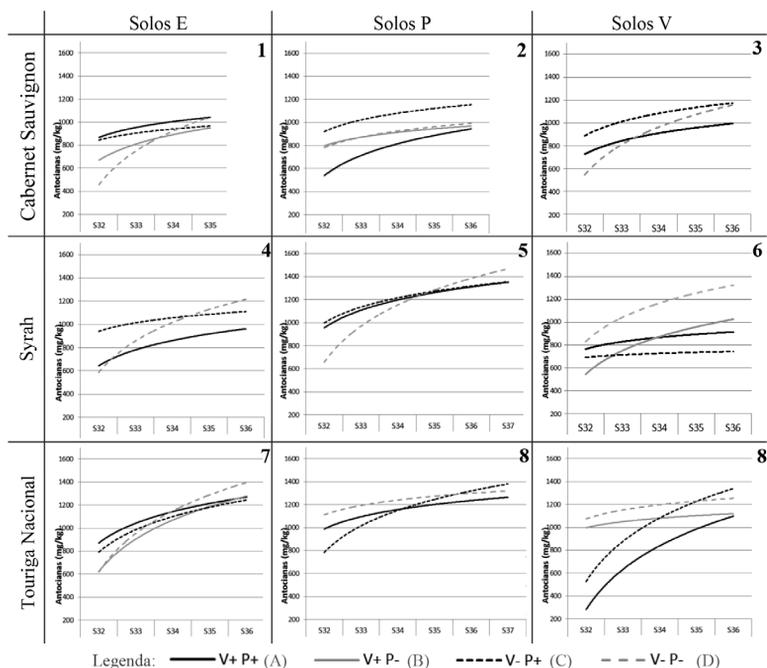


Figura 3 - Evolução da concentração de Antocianas (mg/kg) nas castas Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional nos diferentes grupos de solos

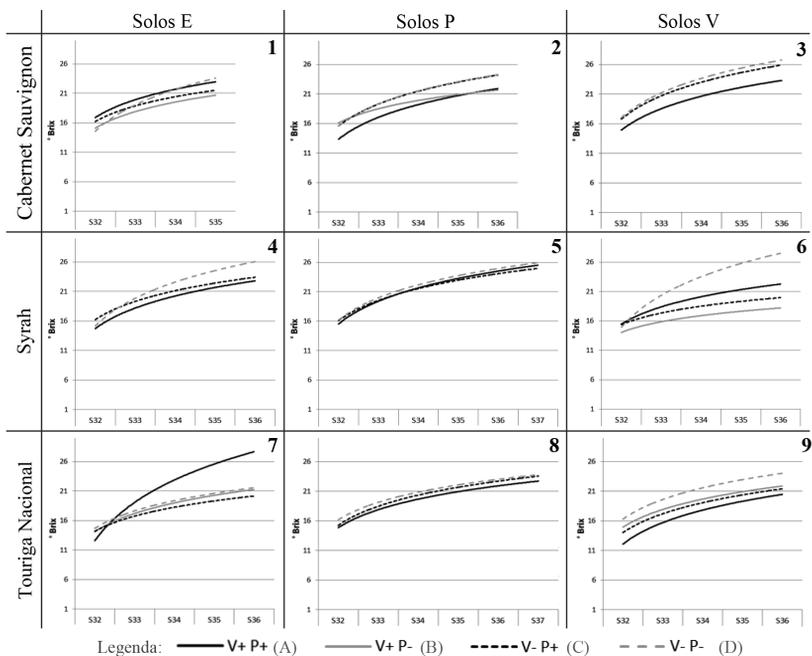


Figura 4 - Evolução do Brix nas castas Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional nos diferentes grupos de solos

3.2 Resultados no Fim da Maturação

3.2.1 Casta e Solo

No que respeita ao parâmetro antocianinas totais, a análise de variância revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as castas Cabernet Sauvignon e Touriga Nacional. Os valores observados na casta Syrah não apresentam diferenças significativas relativamente às outras castas estudadas (Figura 5-A).

Para o mesmo parâmetro, não existem diferenças significativas entre os solos. As diferenças existentes entre os solos, em particular entre o Grupo V e os Grupos E e P não são significativas (Figura 5-B). A interação Casta x Solo não é significativa, apesar da casta Syrah no Grupo V apresentar resultados diferentes (Figura 5-C).

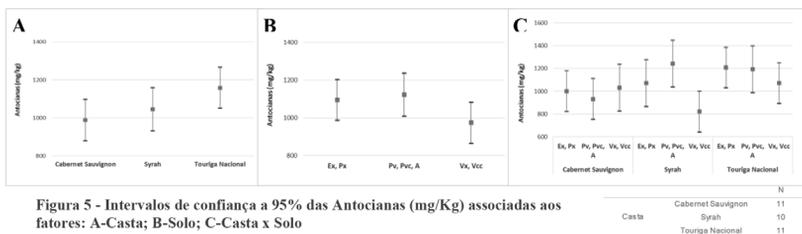


Figura 5 - Intervalos de confiança a 95% das Antocianinas (mg/Kg) associadas aos fatores: A-Casta; B-Solo; C-Casta x Solo

3.2.2 Vigor e Produção

O fator vigor apresenta diferenças significativas e pela análise da figura 6-A é possível confirmar que plantas com menos vigor apresentam em média, teores de antocianinas totais mais elevados quando comparados com os resultados das plantas com mais vigor. Estas diferenças confirmam-se na análise da interação Casta x Vigor (Figura 6-B), em particular na casta syrah, que apresenta diferenças mais acentuadas de níveis de antocianinas totais para o fator vigor.

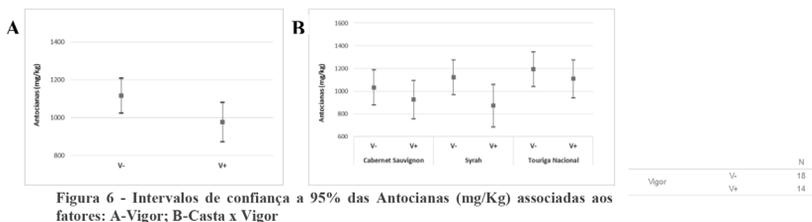


Figura 6 - Intervalos de confiança a 95% das Antocianinas (mg/Kg) associadas aos fatores: A-Vigor; B-Casta x Vigor

No que respeita ao fator produção, a interação Casta x Produção não se revelou significativa para o parâmetro antocianinas totais (Figura 7).

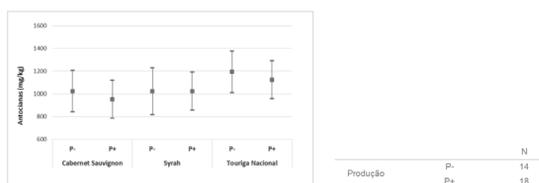


Figura 7 - Intervalos de confiança a 95% das Antocianinas (mg/Kg) associadas ao fator Casta x Produção

Os fatores aleatórios Vigor e Produção não foram responsáveis por diferenças significativas nas antocianinas. Todavia na figura 8 confirma-se que em condições de menor vigor os teores de antocianinas totais são mais elevados e nestas condições, de menor vigor, produções mais altas/planta traduzem-se em teores de antocianinas, em média, mais baixos.

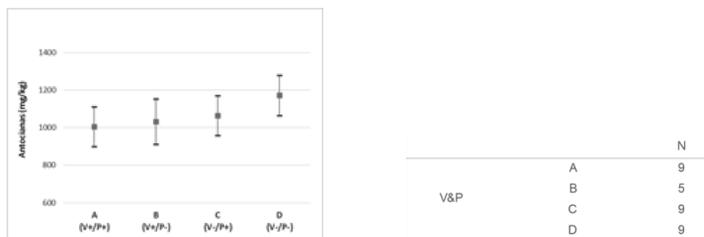


Figura 8 - Intervalos de confiança a 95% das Antocianinas (mg/Kg) associadas aos fatores Vigor e Produção

4 CONCLUSÕES

Durante o período de maturação, verificou-se que os solos mais férteis (P) foram os que conduziram a melhores resultados nos parâmetros qualitativos em todas as castas (teores de açúcares e antocianinas mais altos), com maior expressão na casta Syrah. As plantas com menor vigor (C e D) atingem maiores concentrações de antocianinas, com exceção da casta Cabernet Sauvignon em solos E (menos férteis), onde as plantas mais vigorosas e produtivas (A) têm maior concentração de antocianinas.

Na amostragem imediatamente anterior à vindima, verificou-se que o vigor influenciou significativamente os teores de antocianinas totais. Menor vigor traduziu-se em teores de antocianinas totais, em média, mais elevados. A casta, o solo e a produção não conduziram a diferenças significativas no teor de antocianinas totais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRITA, M.J., RICARDO-DA-SILVA, J. e LAUREANO, O. (2003). Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. *Memorial del I Seminário Internacional de Vitivinicultura*, pp 61-100.
- COZZOLINO, D., DAMBERGS, R.G., JANIK, W.U. e GISHEN, M. (2006). Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 14, pp. 279-289.
- GUIDONI, S., FERRANDINO, A. e NOVELLO, V. (2008). Effects of Seasonal and Agronomical Practices on Skin Anthocyanin Profile of Nebbiolo Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 59, pp. 22-29.
- TOMAZ, F. (2013). *Estudo de evolução de compostos da uva ao longo da maturação em clima semi-árido*. Dissertação para obtenção de Grau Mestre, Universidade Técnica de Lisboa.

PERFIL SENSORIAL E FENÓLICO DE VINHOS BRANCOS MONOVARIETAIS PRODUZIDOS COM CASTAS BRANCAS CULTIVADAS NA REGIÃO DEMARCADA DO DOURO

Alice VILELA^{1*}; Sílvia MARTINS²; Fernanda COSME¹

RESUMO

Os vinhos monovarietais brancos são particularmente apreciados pelos consumidores, porque lhes permite identificar as características das respetivas castas. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar o perfil sensorial e fenólico de nove vinhos brancos monovarietais produzidos com castas brancas cultivadas na Região Demarcada do Douro (Viognier, Viosinho, Touriga Branca, Gewürztraminer, Sauvignon Blanc, Encruzado, Chardonnay, Alvarinho e Verdelho). A avaliação sensorial foi efetuada por um painel de provadores, devidamente treinado, de modo a obter o perfil sensorial de cada vinho através de uma análise descritiva quantitativa. Neste sentido, o vinho que mais se destacou, em quase todos os descritores sensoriais avaliados, foi o vinho monovarietal da casta Gewürztraminer, nomeadamente nos descritores aroma e flavor a *frutos tropicais*, seguido dos vinhos monovarietais da casta Alvarinho e Encruzado que se destacaram pela *cor*. O vinho monovarietal da casta Encruzado ainda se destacou pelo aroma *herbáceo* e *sabor amargo*. A casta Verdelho apresentou maior teor em compostos fenólicos, ao contrário da casta Gewürztraminer, que apresentou o teor mais baixo.

Palavras-chave: Região Demarcada do Douro, Viognier, Viosinho, Touriga Branca, Gewürztraminer, Sauvignon Blanc, Encruzado, Chardonnay, Alvarinho, Verdelho, perfil sensorial.

1. INTRODUÇÃO

O sector vitivinícola em Portugal tem um peso sociocultural e económico de relevo. Contudo, é um sector muito competitivo, exigindo constante inovação e desenvolvimento de novos produtos, por forma a satisfazer as necessidades dos consumidores. Assim, face à procura gradual no mercado nacional e internacional de vinhos brancos, tem-se assistido à sua produção, porém diferenciada quanto às suas características

⁽¹⁾ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Departamento de Biologia e Ambiente - Edifício de Enologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.
*avimoura@utad.pt

⁽²⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

sensoriais (ROBINSON, 2007), podendo esta ser uma vantagem notável na escolha de um vinho pelo consumidor, dado estes apresentarem aromas frutados e florais distintos, muito do agrado do consumidor (MANFROI e RIZZON, 1996).

Logo, um fator de diferenciação importante para um vinho branco é a sua composição aromática. Este parâmetro está diretamente relacionado com a casta de onde provém (VILANOVA *et al.*, 2013). Sabe-se que existem cerca de 260 castas com uma provável origem em Portugal ou introduzidas no passado (SIMÕES, 2007). Apesar desta mais-valia tem-se assistido a uma perda da variabilidade existente no nosso país, em parte associada à reestruturação da vinha, bem como ao progresso em geral, onde se inclui a globalização, introdução de castas não autóctones e as tendências de consumo (MARTINS, 2009).

Este trabalho pretende dar um contributo para um melhor conhecimento dos vinhos monovarietais de nove castas brancas autóctones e não autóctones cultivadas na Região Demarcada do Douro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinhos

Os vinhos monovarietais utilizados neste trabalho foram vinificados, a partir de nove castas brancas cultivadas na Região Demarcada do Douro, entre as quais as castas: Alvarinho, Chardonnay, Encruzado, Gewürztraminer, Sauvignon Blanc, Touriga Branca, Viosinho, Viognier e Verdelho.

2.2. Parâmetros físico químicos convencionais

O teor alcoólico; a acidez volátil; a acidez total e a acidez fixa foram determinadas de acordo com os métodos descritos pela OIV (2012).

2.3. Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

A determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos efetuou-se de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não-flavonóides dos vinhos foram determinados pela absorvância a 280 nm, após a reação com o formaldeído, de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais foi possível determinar os compostos fenólicos flavonóides. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração elaborada com o ácido gálico. Todas as determinações foram efetuadas em duplicado.

2.4. Determinação da cor e da capacidade de acastanhamento

A cor foi determinada pela absorvância a 420 nm (A_{420} nm) numa cuvette de 1cm de percurso ótico (OIV, 2012). A capacidade de acastanhamento foi determinada

de acordo com o método descrito por SINGLETON e KRAMLING (1976). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.5. Análise Sensorial

2.5.1. Pannel de provadores

O pannel de provadores era constituído por 10 pessoas, da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Todos os provadores tinham treino em análise sensorial. As provas decorreram das 16.00 às 17.00 horas, numa sala com ambiente controlado e material necessário para cada tarefa, de acordo com a norma ISO 8589:2007.

2.5.2. Prova dos Vinhos

As amostras de vinho foram apresentadas codificadas, com códigos de três dígitos, servidas à temperatura ambiente, em copos apropriados (ISO 3591:1977). Foi fornecida água mineral e tostas para limpeza do palato entre a avaliação das amostras.

Foi efetuada uma Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), utilizando-se fichas de prova com descritores adaptados de acordo com o procedimento descrito por MONTEIRO *et al.* (2014).

Foram avaliados os seguintes descritores / atributos: *cor, limpidez, intensidade, floral, fruta de árvore, frutos tropicais, frutos secos, frutos citrinos, especiarias, pimento, pimenta verde, mel, herbáceo, baunilha, oxidado, doçura, amargo, acidez, corpo, intensidade, flavor frutado, flavor floral, flavor vegetal e persistência*, com uma escala estruturada de 1 a 5 pontos (ISO 4121:2003).

2.6. Análise estatística

Os resultados da avaliação físico-química foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao Teste de Tuckey a 5% de significância para comparação entres as médias. Aos dados da análise sensorial foi aplicada uma Análise em Componentes Principais (ACP) e Análise de *Clusters* (pela distância Euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair-group average*). A avaliação do perfil sensorial das amostras foi realizada através do gráfico aranha. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* STATISTICA 2010 (Stat Soft Inc., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros físico-químicos convencionais

O Quadro 1 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos convencionais dos vinhos estudados. O teor alcoólico dos vinhos oscilou entre 10,4 e 13,3 % (v/v), apresentando o vinho da casta Sauvignon Blanc o valor mais elevado. Em relação à acidez total, os vinhos das nove castas apresentam valores que oscilam entre 6,9 e 9,3

(g/L de ácido tartárico). Estes valores são semelhantes aos apresentados por GUERRA (2009) em vinhos monovarietais de castas autóctones da região Demarcada do Douro.

Quadro 1- Parâmetros físico químicos convencionais dos vinhos brancos.

Vinhos	Teor alcoólico (% v/v)	Acidez total. (g/L ác. tart.)	Acidez Volátil (g/L ác. acét.)	Acidez fixa (g/L ác. tart.)
Gewürztraminer	11,8	6,9	0,25	6,65
Chardonnay	12,3	7,6	0,50	7,10
Sauvignon Blanc	13,3	8,8	0,50	8,30
Viognier	11,5	8,2	0,25	7,95
Viosinho	11,7	9,3	0,50	8,80
Touriga Branca	10,7	8,4	0,13	8,28
Verdelho	12,8	7,2	0,38	6,83
Encruzado	10,4	8,7	0,50	8,20
Alvarinho	11,7	8,5	0,38	8,13

3.2. Compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides

O teor de compostos fenólicos totais dos vinhos das castas estudadas (Quadro 2), apresentam valores entre 129 e 152 g/L de ácido gálico, o vinho da casta Gewürztraminer obteve a média mais baixa (129 g/L de ácido gálico), enquanto o vinho da casta Verdelho apresenta a média mais alta (152 g/L de ácido gálico).

Os não flavonóides obtiveram a média significativamente mais baixa (37 g/L de ácido gálico) no vinho da casta Viognier. Os valores significativamente mais elevados dos compostos fenólicos não flavonóides foram obtidos nos vinhos das castas Viosinho, Touriga Branca, Verdelho e Alvarinho. Para os compostos flavonóides, os vinhos das castas Chardonnay e Viognier obtiveram o valor significativamente mais elevado (106 e 103 g/L de ácido gálico, respetivamente) enquanto o vinho da casta Gewürztraminer apresentou o valor significativamente mais baixo, 82 g/L de ácido gálico, o que seria de esperar pelos valores obtidos pelos dois parâmetros anteriores.

Os vinhos brancos apesar de apresentarem um menor conteúdo em compostos fenólicos, apresentam teores importantes de compostos fenólicos não flavonóides nomeadamente ácidos fenólicos e outros componentes antioxidantes que lhes conferem um efeito biológico significativo (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2009).

Quadro 2- Compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides.

Vinhos*	Fenóis Totais (g/L ácido gálico)	Não flavonóides (g/L ácido gálico)	Flavonóides (g/L ácido gálico)
Gewürztraminer	129±1 ^a	47±1 ^c	82±0 ^a
Chardonnay	149±1 ^c	43±1 ^b	106±0 ^g
Sauvignon Blanc	133±0 ^a	45±0 ^b	88±0 ^{b, c}
Viognier	140±2 ^b	37±0 ^a	103±2 ^{f, g}
Viosinho	142±1 ^c	54±1 ^d	88±1 ^{a, b, c}
Touriga Banca	144±2 ^b	52±1 ^d	91±1 ^{c, d}
Verdelho	152±2 ^c	53±1 ^d	99±3 ^{e, f}
Encruzado	131±0 ^a	47±1 ^c	84±1 ^{a, b}
Alvarinho	148±1 ^c	53±1 ^d	95±2 ^{d, e}

* Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 0,05% de significância).

3.3. Cor e Capacidade de acastanhamento

Em relação à cor dos vinhos brancos (Quadro 3), o valor significativamente mais baixo está presente nos vinhos das castas Sauvignon Blanc e Encruzado (0,064 u.a). A maior capacidade de acastanhamento foi demonstrada pelo vinho da casta Alvarinho (0,007 u.a), apesar de não ser significativamente diferente em relação aos restantes. Os valores obtidos são muito próximos de zero o que nos indica que os vinhos são resistentes ao acastanhamento, tal como no estudo de ESCUDEIRO e ALVES (2012), também neste estudo, o vinho da casta Viosinho apresenta baixa suscetibilidade à oxidação.

Quadro 3- Cor e capacidade de acastanhamento dos vinhos brancos.

Vinhos*	Cor	Capacidade de acastanhamento
Gewürztraminer.	0,069±0,001 ^{a, b}	0,004±0,001 ^a
Chardonnay	0,127±0,012 ^c	0,001±0,000 ^a
Sauvignon Blanc	0,064±0,004 ^a	0,004±0,001 ^a
Viognier	0,122±0,001 ^c	0,006±0,001 ^a

Viosinho	0,124±0,004 ^c	0,000±0,000 ^a
Touriga Banca	0,089±0,001 ^b	0,003±0,003 ^a
Verdelho	0,086±0,002 ^{a, b}	0,006±0,000 ^a
Encruzado	0,064±0,001 ^a	0,003±0,001 ^a
Alvarinho	0,112±0,002 ^c	0,007±0,000 ^a

* Vinhos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 0,05% de significância).

3.4. Perfil sensorial

O perfil sensorial de cada um dos vinhos é mostrado graficamente na Figura 1. A média dos valores atribuídos pelos provadores a cada atributo é marcada 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.

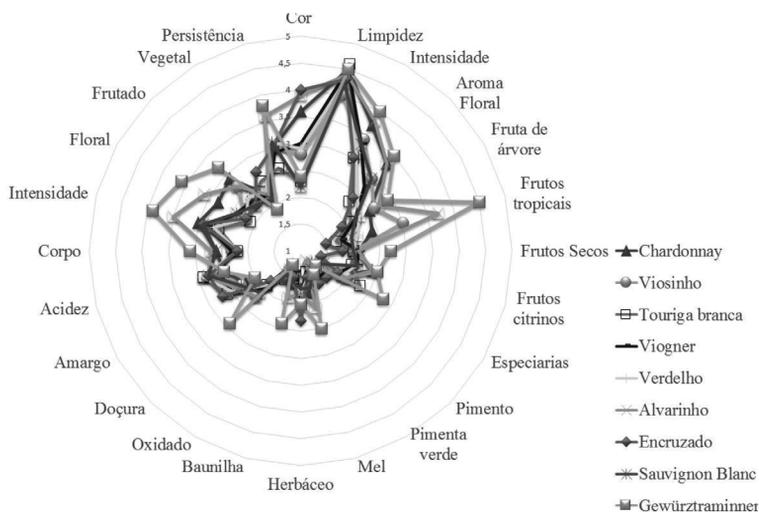


Figura 1 - Perfil sensorial dos nove vinhos monovarietais das castas estudadas.

Pela análise da Figura 1, verificamos que o vinho que mais se destaca dos restantes, em quase todos os descritores, é o vinho da casta Gewürztraminer, seguido dos vinhos das castas Alvarinho e Encruzado que se destacam pela sua cor. O vinho da casta

Encruzado ainda se destaca pelo aroma herbáceo e sabor amargo. Os vinhos das castas Verdelho e Viogner, não se destacam em nenhum descritor em particular.

A Figura 2 (A) apresenta os resultados obtidos na Análise de *Clusters* (distância euclidiana média, método UPGMA – *unweighted pair-group average*) após a análise sensorial dos diferentes vinhos monovarietais. No dendograma (Figura 2, A), é possível observar a formação de três grupos, identificados a seguir: grupo 1, formado pelos vinhos das castas Chardonnay, Viosinho e Alvarinho; grupo 2, formado pelos vinhos das castas Touriga Branca, Viogner, Verdelho, Sauvignon Blanc e Encruzado; Grupo 3 por apenas um vinho pertencente à casta Gewürztraminer.

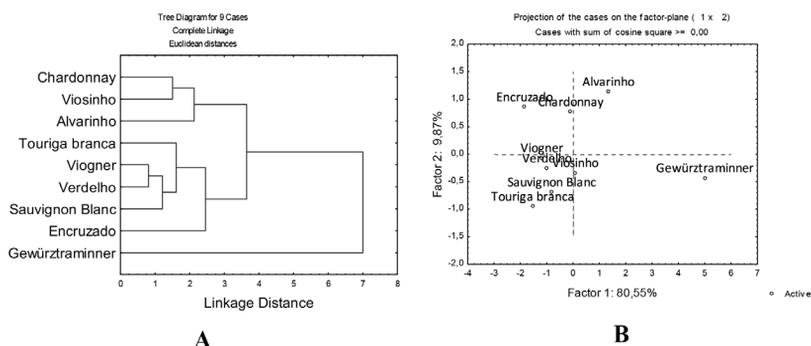


Figura 2 – (A) Dendograma (análise de *clusters*) dos diferentes vinhos monovarietais das castas estudadas. **(B)** Projeção da *cov*-ACP das amostras de vinhos das diferentes castas, avaliados sensorialmente.

Na análise em componentes principais (ACP) o primeiro componente contribuiu com 80,55% da variância total e o segundo com 9,87% (Figura 2, B) Estes valores são superiores a trabalhos onde a mesma análise em Componentes principais foi efetuada em vinhos de castas brancas (LIANG *et al.*, 2013). A ACP mostra-nos, efetivamente, que o vinho da casta Gewürztraminer se encontra isolado, tendo como descritor importante o *aroma a frutos tropicais* e o vinho da casta Encruzado tem como principal característica a sua *cor*. Os restantes vinhos, apesar de parecerem separados em termos de grupos, não se parecem diferenciar por nenhum descritor em particular e apresentam características semelhantes entre si, dentro do grupo, uma vez que todos os descritores, exceto a cor e o aroma a frutos tropicais, se parecem localizar no centro da ACP (Figura 2, B).

4. CONCLUSÕES

O vinho que mais se destaca dos restantes, em quase todos os descritores, é o vinho da casta Gewürztraminer, seguido dos vinhos das castas Alvarinho e Encruzado que se destacam pela sua *cor*. O vinho da casta Encruzado ainda se destaca pelo *aroma herbáceo* e *sabor amargo*. Os vinhos das castas Verdelho e Viogner, não se destacam em nenhum descritor em particular. O vinho da casta Verdelho apresenta maior teor em compostos fenólicos, ao contrário do vinho da casta Gewürztraminer que apresenta o teor mais baixo na sua constituição. O vinho da casta Viosinho foi o que apresentou menor suscetibilidade à oxidação.

AGRADECIMENTOS

Às Professoras Doutoras Ana Barros e Paula Lopes pelo fornecimento das amostras. A todo o painel de provadores da ECVA-DeBA/UTAD (Ana Abraão, Ana Santos, António Lage, António Bacelar, António Inês, Berta Gonçalves, Eunice Bacelar, Paula Ribeiro, Rosário Anjos e Teresa Pinto), pelo excelente trabalho efetuado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESCUDEIRO I.; ALVES J. (2012). O programa de desenvolvimento rural da região Norte. O PRODER e o futuro. Mirandela: DRAPN.
- GUERRA J. (2009). Caracterização Enológica de Castas Autóctones. Região Demarcada do Douro. Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro. 1-16.
- ISO 3591 (1977) Sensory analysis - Apparatus - Wine-tasting glass. International Organization for Standardization: Geneve.
- ISO 4121 (2003) Sensory analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales. International Organization for Standardization: Geneve.
- ISO 8589 (2007) Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization: Geneve.
- KRAMLING T. E.; SINGLETON V. L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
- LIANG H.-Y.; CHEN J.-Y.; REEVES M.; HAN B.-Z. (2013). Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*, 51, 855-865.
- MANFROI V.; RIZZON L.A. (1996) Influencia do tempo de maceração e do número de recalques nas características físico-químicas e minerais do vinho Cabernet Sauvignon *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 60-65
- MARTINS A. (2009). A diversidade das videiras autóctones portuguesas e as ações programadas para a sua guarda e valorização. *Colóquio ALABE – A inovação no sector vinícola*, Porto.
- MONTEIRO B.; VILELA A.; CORREIA E. (2014). Sensory profile of pink port wines: Development of a flavour lexicon. *Flavour and Fragrance Journal*, 29,50-58.
- OIV (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. ROBINSON J. (2007). Vinho Branco? Yes!, *Blue Wine*, 12.
- RODRÍGUEZ-BERNALDO A.Q.; LAGE-YUSTY M.A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ J. (2009). HPLC analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.
- SIMÕES O. (2007). As Denominações de Origem de vinhos portugueses e a recuperação de variedades nacionais de videira.
- 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.
- STAT SOFT INC (2010) Electronic Statistics. Tulsa, USA.
- VILANOVA M.; GENISHEVA Z.; GRAÑA M.; OLIVEIRA J.M. (2013). Determination of Odorants in Varietal Wines from International Grape Cultivars (*Vitis vinifera*) Grown in NW Spain. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34, 212-222.

PESQUISA DE MARCADORES QUÍMICOS E SENSORIAIS ASSOCIADOS AO DESCRITOR “CAUDAS” EM AGUARDENTES VÍNICAS

Margarida FAÍSCA^(1,2); Ludovina GALEGO^(1,3) Ilda CALDEIRA^(2,4)

Resumo

A aguardente vínica pode ser obtida por destilação contínua ou descontínua. No processo descontínuo, em alambiques, é necessária a separação das frações de destilação, realizando-se a eliminação da fração inicial (cabeça) e da fração final (cauda).

Este trabalho teve como objetivo encontrar, descritores sensoriais para caracterizar a fração final da destilação e correlacionar esses descritores com os compostos voláteis mais abundantes.

Para o efeito, foram realizados, à escala laboratorial, dois ensaios de destilação de vinho branco, com recolha das diferentes frações durante o processo de destilação.

Os resultados da avaliação sensorial, realizado pelo grupo de prova de aguardentes do INIAV, permitiram seguir a evolução do descritor “cauda” ao longo do processo de destilação, verificando-se uma relação linear significativa entre o volume de destilado acumulado e aumento da intensidade deste descritor, na fase final da destilação. Os outros descritores mais frequentes para a fração final (cauda) foram: pesado, cozido, ranço e fumo.

Os compostos voláteis maioritários, na fase final da destilação, quantificados por GC-FID e identificados por GC-MS, foram o 2-feniletanol, o lactato de etilo e o furfural. Foi verificado que o descritor “cauda” apresentou a relação linear significativamente mais elevada com o teor em 2-feniletanol.

Palavras-chave: Aguardente vínica, caudas, 2-feniletanol, análise sensorial

1. INTRODUÇÃO

A aguardente vínica é uma bebida espirituosa que é “obtida por destilação a menos de 86 % vol. de vinho ou de vinho aguardentado destinado à destilação ou por redestilação de um destilado de vinho a menos de 86 % vol., com um teor de substâncias voláteis igual ou superior a 125 gramas por hectolitro de álcool a 100 % vol., e com um teor máximo de metanol de 200 gramas por hectolitro de álcool a 100 % vol.” (Reg. CEE 110/2008).

⁽¹⁾ Instituto Superior de Engenharia-Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro

⁽²⁾ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária-Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar - Laboratório de Enologia - Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia, Dois Portos, Quinta da Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Portugal

⁽³⁾ MeditBio, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

⁽⁴⁾ ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

A qualidade da aguardente vínica é influenciada pelos fatores solo, clima, variedade de uva, bem como pelos processos de vinificação e armazenamento, destilação e envelhecimento (BELCHIOR *et al.*, 2015).

A destilação tradicional realizada em alambique necessita de uma correta separação das frações de destilação, cabeças, corações e caudas, as quais apresentam uma composição química muito diferenciada (LEAUTÉ, 1990). A fração final, cauda, apresenta um aroma pesado e desagradável, aparecendo o descritor caudas na avaliação sensorial de aguardentes (CALDEIRA *et al.*, 1999; PEÑA Y LILLO *et al.*, 2005) mas apresentando uma correlação negativa com a qualidade global da aguardente (CALDEIRA *et al.*, 2006). Foi pesquisada em trabalhos anteriores a correlação entre o descritor caudas e o teor de alguns ácidos (acético, hexanóico, decanóico, dodecanóico), mas não foi encontrada nenhuma relação (CALDEIRA *et al.* 2008).

Assim, este trabalho teve por objetivo tentar identificar quais os compostos voláteis maioritários que se encontram mais associados ao defeito sensorial das caudas, recorrendo para o efeito à técnica de cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID), para a quantificação de compostos, e à pesquisa de correlações desses resultados com os da análise sensorial. Este trabalho pretendia igualmente encontrar mais descritores sensoriais para caracterizar o aroma associado às caudas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Destilação de vinho à escala laboratorial

Realizou-se uma destilação de vinho branco (Quadro 1), num alambique de capacidade máxima de 10 L. O procedimento foi repetido tendo-se efetuado duas réplicas de destilação (Ensaio 1 e ensaio 1'). Durante a destilação, recolheram-se as várias frações de destilação para efeitos de análise sensorial e físico-química, tendo-se recolhido um total de 14 frações por cada destilação.

Quadro 1 - Composição físico-química do vinho branco utilizado nos ensaios de destilação:

Massa volúmica (g/cm ³)	Teor alcoólico (%v/v)	Acidez volátil (g ác. acético/dm ³)	pH	Acidez total (g ác. tartárico/dm ³)
0,9882	14,3	0,74	3,50	5,57

2.2. Análises físico-químicas

2.2.1. Vinho branco

No vinho utilizado para os ensaios de destilação realizaram-se as seguintes determinações analíticas (OIV, 2012): massa volúmica – aerometria; título alcoométrico volúmico-destilação e densimetria eletrônica; acidez total – titulometria de neutralização; acidez volátil – destilação e titulometria. O metanol, acetaldeído e álcoois superiores foram analisados por GC-FID do destilado, obtido para a determinação do título alcoométrico volúmico (CT83, 1990).

2.2.2 Frações de destilação

Nas frações recolhidas durante a destilação de vinho branco realizaram-se as seguintes determinações:

Título alcoométrico volúmico – por cada 80 ml de volume recolhido na destilação, determinou-se o título alcoométrico volúmico por densimetria eletrônica, no aparelho Anton Paar (OIV, 2014)

Metanol, acetaldeído, acetato de etilo, álcoois superiores e outros compostos voláteis -a quantificação de metanol, acetaldeído, acetato de etilo e álcoois superiores foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID), seguindo a metodologia proposta pela NP 3263 e nas condições cromatográficas previamente estabelecidas e validadas para aguardentes víquicas e bagaceiras (LUÍS *et al.*, 2011). O cromatógrafo utilizado foi o Focus, (Thermo Scientific, EUA) equipado com um detetor de ionização de chama FID (250°C), injetor (200°C) a funcionar em modo de divisão e com uma coluna capilar de sílica de polietileno glicol (DB-WAX da J & W Scientific, Folsom, CA, EUA), 60m x 0,32mm x 0,25 µm. O gás de arraste foi o hidrogénio (3,40 mL/min) e a razão de divisão de 1:6. O volume de injeção foi de 1,0 µL. No entanto, como se pretendia analisar amostras diferentes (frações de destilação) procedeu-se a uma fase inicial de verificação e adaptação das condições cromatográficas para este tipo de amostra. Testaram-se modificações ao programa de gradiente térmico estudado em LUÍS *et al.* (2011) e ensaiou-se a injeção de frações do destilado sem adição de padrão interno. A injeção de várias frações de destilação sem adição de padrão interno permitiu verificar, que não saía nenhum composto no tempo de retenção do padrão interno, pelo que se continuou a utilizar o 4-metil-2-pentanol, o padrão interno habitualmente utilizado, na análise de aguardentes víquicas e bagaceiras. Relativamente ao gradiente térmico utilizou-se o descrito em LUIS *et al.* (2011) tendo-se aumentado o tempo da isotérmica final: 35°C (8 minutos em isotérmica), 10 °C/min até 200 °C (25,5 minutos).

A quantificação do metanol, acetaldeído, acetato de etilo e álcoois superiores foi realizada com base na análise de soluções hidroalcoólicas de substâncias padrão com concentração conhecida. A quantificação do 2-feniletanol, lactato de etilo e furfural foi realizada com base no padrão interno, assumindo arbitrariamente o valor de um para o fator de resposta.

A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) tendo-se utilizado as seguintes condições: GC-MS Magnum (Finnigan MAT SanJose, CA, USA) equipado com uma coluna capilar de sílica de polietilenoglicol (DB-WAX da J&W: 30 m x 0,25 mm x 0,25

_m); injetor e linha de transferência a 250°C; gás de arraste hélio (12psi de pressão interna e razão de divisão de 1:60), volume de injeção 0,2-0,4_1. O espectrômetro de massas trabalhou em modo de impacto de elétrons a 70 eV, avaliando uma gama m/z de 40-340 amu. A identificação foi realizada por comparação do espectro de massa com os das bibliotecas de espectros (NIST e WILEY) e confirmada com a análise das substâncias padrão. O programa de temperatura utilizado foi semelhante ao apresentado anteriormente para o GC-FID.

2.3 Análise sensorial

As frações de destilação foram submetidas a análise sensorial, para a avaliação e descrição do aroma.

Efetuar-se duas sessões de provas, uma para cada conjunto de frações de destilação de cada réplica de ensaio. As sessões de prova decorreram de manhã na sala de provas do INIAV-Dois Portos, tendo-se utilizado um painel de 10 provadores, com experiência de prova de aguardentes. A cada amostra foi atribuída um código de números aleatórios. A ordem pela qual as amostras foram apresentadas aos provadores, seguiu o delineamento experimental, proposto por MACFIE *et al.* (1989) de modo a eliminar o efeito de posição e da ordem de prova. As amostras foram apresentadas em frascos fechados, rolhados, contendo cada um deles 5 mL da fração em avaliação.

Pediu-se a cada provador que descrevesse o aroma (apenas avaliação orthonasal) de cada frasco e que classificasse a intensidade do aroma a caudas, quando este aroma fosse detetado, conforme a ficha de prova elaborada para esse efeito (FAISCA, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos relativamente à variação do teor alcoólico e dos teores de compostos voláteis ao longo do processo de destilação são apresentados na Figura 1. Na mesma figura apresenta-se também a variação da intensidade média do descritor caudas atribuída pelo grupo de prova às frações de destilação. Como se pode observar (Fig. 1 a e b) o aroma a caudas começa-se a detetar a meio do processo de destilação, quando o

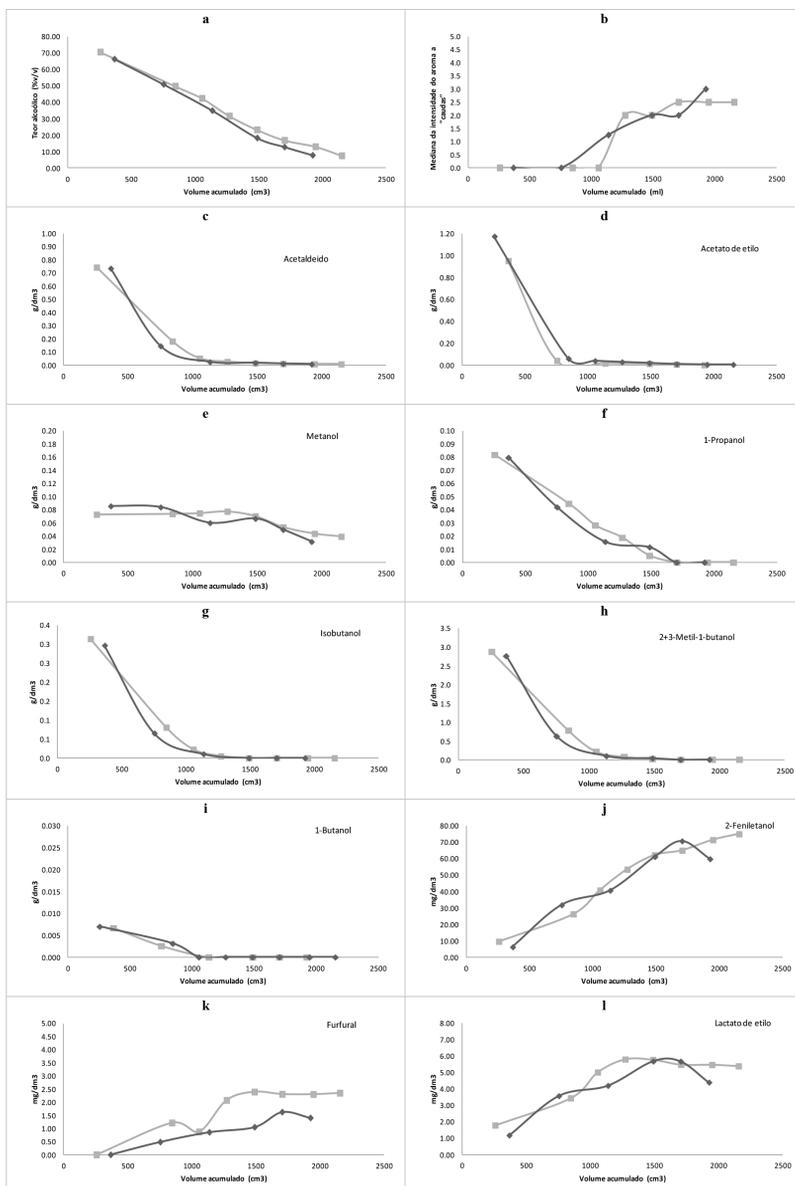


Figura 1 – Variação do teor alcoólico, da intensidade do aroma a caudas e do teor de varios compostos voláteis ao longo da destilação de um vinho branco (Ensaio 1-cinzeno claro; Ensaio 1'-cinzeno escuro).

teor alcoólico ainda é muito elevado (cerca de 30%). Na fase final verificou-se uma relação linear ($r = 0,82$) entre o volume acumulado e a intensidade do descritor caudas. Relativamente aos compostos verifica-se, tal como era esperado que o acetato de etilo bem como o acetaldeído são compostos do tipo 1, de acordo com LEAUTÉ (1990), que apresentam baixos pontos de ebulição e elevada solubilidade em álcool e portanto saem maioritariamente na fase inicial de destilação, nas cabeças. Os álcoois superiores superiores (Fig. 1 f,g,h,i) apresentam uma curva do tipo 2, de acordo com a classificação do mesmo autor, saindo na fase inicial (cabeças) e fase intermédia da destilação (coração). Os teores destes compostos são nulos na fração final de destilação (cauda). Para o metanol, não se verificou um comportamento semelhante aos álcoois superiores proposto por LEAUTÉ (1990), mas antes a sua saída ao longo de todo o processo de destilação. O 2- feniletanol e lactato de etilo começam a destilar com mais intensidade a partir do meio da destilação continuando na fase final. O furfural que não existe na fase inicial começa a aparecer também no meio da destilação, aumentando na fase final. Assim, e porque estes três últimos compostos se encontravam mais associados às caudas pesquisou-se a correlação linear entre o seu teor e a intensidade do aroma avaliada pelo grupo de prova. Verificou-se que a correlação mais elevada ($r = 0,89$) se detetou com o teor de 2- feniletanol (Fig. 2). Assim, este trabalho sugere a possibilidade deste composto, que apresenta um aroma agradável a rosas (CALDEIRA *et al.* 2008), poder funcionar como marcador indireto do aroma a caudas. Assim, espera-se futuramente, analisar o teor deste composto num elevado número de amostras de caudas e de destilados para que se estabeleça um valor que se possa associar à presença evidente do defeito a caudas. Relativamente à pesquisa de outros descritores sensoriais para as frações finais de destilação, contactou-se que os descritores mais frequentes foram caudas, pesado, cozido, ranço e fumo (Fig.3). O facto do grupo de prova ter experiência em prova de aguardentes poderá justificar que o termo mais usado tenha sido “caudas”. Portanto, poder-se-á considerar realizar futuramente uma abordagem similar mas com provadores não treinados em aguardentes.

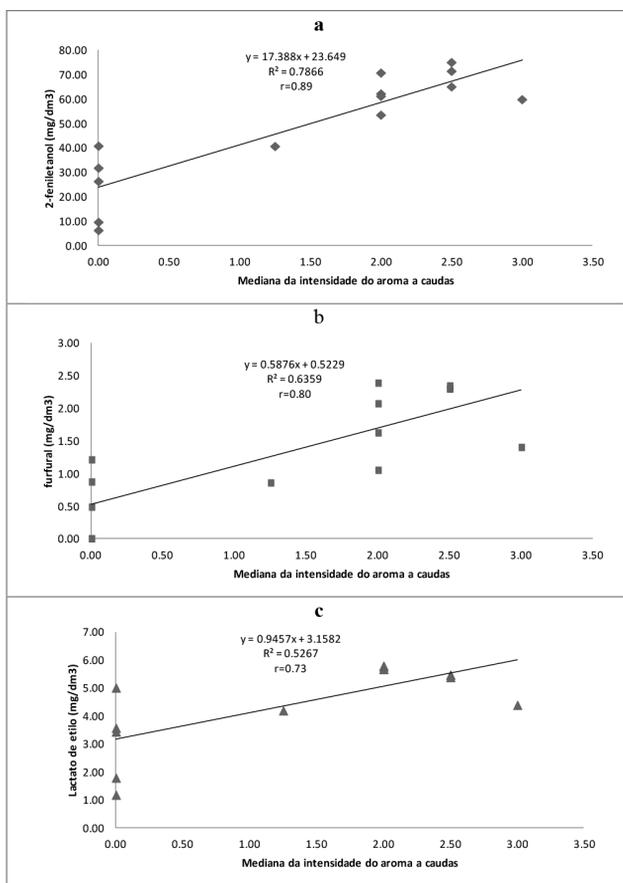


Figura 2 – Variação da mediana da intensidade do aroma “caudas” *versus* teor de 2- feniletanol(a), furfural(b) e lactato de etilo(c). Ajustamento de modelo linear com apresentação da curva do modelo e dos respectivos coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (r).

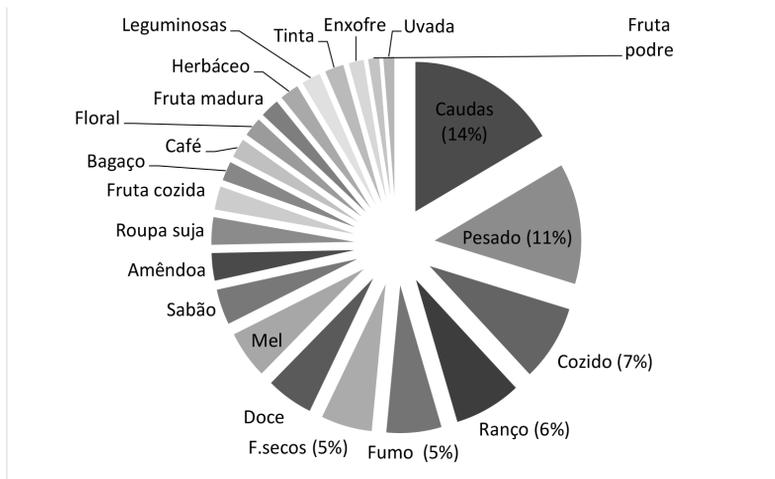


Figura 3 – Descritores propostos pelo grupo de prova para a descrição do aroma da fração final de destilação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de Deolinda Mota e Otilia Cerveira do INIAV nas análises físico-químicas das aguardentes e agradecem também a todos os provadores a disponibilidade e interesse demonstrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELCHIOR A.P., CANAS S., CALDEIRA I., CARVALHO E. 2015. Aguardentes vinícolas - Tecnologias de produção e envelhecimento. Controlo de qualidade ISBN 978-989-723-133-9 Publindústria - Edições Técnicas, 181 p.
- CALDEIRA I., BRUNO DE SOUSA R., BELCHIORA. P., CLÍMACO M. C. 2008. A sensory and chemical approach to the aroma of wooden aged Lourinhã wine brandy. *Ciência Téc. Vitiv*, 23, 97-110.
- CALDEIRA I., CANAS S., COSTA S., CARVALHO E., BELCHIOR A.P., 1999. Formação de uma câmara de prova organoléptica de aguardentes velhas e selecção de descritores sensoriais. *Ciência Téc. Vitiv*, 14, 21-30.
- CALDEIRA I., MATEUS A.M., BELCHIOR A.P., 2006 Flavour and odour profile modifications during the first five years of *Lourinhã* brandy maturation on different wooden barrels. *Anal. Chim.Acta* 563: 264-273. DOI: 10.1016/j.aca.2005.12.008
- CT83, 1990. NP 3263; Bebidas alcoólicas e espirituosas - determinação dos teores de etanal, ace-

- tato de etilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-propeno-1-ol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol+3-metil-1-butanol; IQA; Lisboa.
- FAISCA M. 2012 Pesquisa de Marcadores Químicos e Sensoriais associados à Fração final de Destilação em Aguardentes Vinicas. Relatório de estágio. Instituto Superior de Engenharia. Universidade do Algarve. LÉAUTÉ R., 1990. Distillation in alambique. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 90-103.
- LUIS A.CATARINA P.M.N., MOTA, DEOLINDA, O. ANJOS, CALDEIRA I. 2011. Single-laboratory validation of determination of acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and fusel alcohols in wine spirits, brandies and grape marc spirits using GC-FID *Ciência Téc. Vitiv.* 26(2):69-76.
- MACFIE HJM, BRATCHELL N, GREENHOFF H, VALLIS LV 1989 Designs to balance the effects of order of presentation and first order carryover effects in hall tests. *J Sens Stud* 4:129-148.
- OIV 2012. Compendium of International Methods of Wine and must Analysis, Paris
- OIV. 2014 Compendium of International Methods of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin. OIV, Paris,
- PENÃ Y LILLO M., LATRILLE E., CASAUBON G., AGOSIN E., BORDEU E., MARTIN N., 2005. Comparison between odour and aroma profiles of Chilean Pisco spirit. *Food Qual. Pref.*, 16, 59-70.

POTENTIAL USE AS A NATURAL FOOD ADDITIVE OF THE RAISIN COMPRESSED WASTES

Urbano, B.; Lopez-Toledano, A.; Serratosa, M.P.; Moyano, L.; Zea, L. and Merida, J.

Fruit Processing Group
Dpto. Química Agrícola y Edafología
Edif. Marie Curie, 3ª planta
Campus Universitario Rabanales
14075 Córdoba (España)

altoledano@uco.es

In this study, the raisin compressed wastes derived from Tempranillo grapes has been characterized. The raisining has been done in a chamber-drying under controlled conditions. They were evaluated for their use as a natural additive because of their antioxidant properties, their colouring power and their complex aromatic profile. To obtain extracts, it has been used three green solvents (Water, Water/Ethanol 5% and Water/Ethanol 12%). It has studied polyphenols rate and antioxidant activity due to the importance of taking food with high reducing agents content and antioxidant compounds for their power to prevent diseases like cancer. It has also been studied the colour and their aromatic profile for its use in food industry as a natural additive without chemical compounds. The results have shown that extracts (from Water/Ethanol (5%) solvent) have higher content of polyphenols and antioxidants compounds, better colouring properties and an aromatic profile more complex and pleasant. However, further investigation is necessary for improving the method of valuation as a natural additive.

Keywords: Antioxidant activity; valorization; sweet red wines; green solvents

INTRODUCTION

Sweet wine Pedro Ximenez is elaborated in Montilla-Moriles region (Southern Spain). This is made through a sun-drying process of grapes variety Pedro Ximenez. The grapes are extended and exposed to sunlight on mats drying of about 20 meters each. The sun-drying process usually lasts between 7 or 10 days. In this period the sugar content of the grapes increases. Drying of the grapes produces a dark-colored and intensely sweet must with a strong raisin flavour (Serratosa *et al.*, 2011).

Also, in this production area are starting to produce sweet red wines from Tempranillo grapes. These wines are characterized by their reddish-brown color and their taste, which is less sugary than taste of sweet white wine. This brown color is due to a traditional sun drying of red grapes, this is the same as used to obtain Pedro Ximenez sweet wine. However, researchers from University of Cordoba have developed sweet

red wines with raisining on chamber-drying under controlled conditions and they obtained sweet red wine with red tonality similar to red wine traditional (Márquez *et al.*, 2011). The skins, byproducts of sweet red wines, show a reddish- brown color too. So, there is a possibility that they contain anthocyanins and these can have antioxidant activity. Antioxidants components could be used as a natural additive because these are important for health due to they are agents that protect body tissues against oxidative stress and reduce the likelihood of diseases such as cancer. Therefore, byproducts of sweet red wines could be used as natural food additives for yogurts, cookies and others fortified foods.

The use of chemicals is causing negative impacts on health and the environment. The population start to worry about the processes involved in the use, manufacture and the effect of chemicals on their health and in the environment. As a result of this concern appears Green Chemistry. Nowadays, this is being imposed in all areas, especially in the agroalimentary world in particular with additives. One of the principles of Green Chemistry (Anastas *et. al.*, 1998) is the use of green solvents, which are easier to eliminate of environment and they do not suppose a danger for the health.

In this study is made a characterization the properties of byproducts of sweet red wines for their valuation as additive natural using green solvents.

MATERIALS Y METHODS

Tempranillo grapes grown in the IFAPA (Andalusian Institute of Agrarian Research and Training, Fisheries, Food and Organic Production) located in Cabra (Córdoba, southern Spain). It has been used to obtain sweet red wine from the raisining in a chamber (Márquez *et al.*, 2011) as opposed to the sun raisining traditional, this is typical of the Montilla-Moriles production area. After obtaining the must, the skins have been frozen at 4 °C until use.

Green solvents used in the extraction: Water (H₂O); Water/Ethanol 5% (C₂H₆O); Water/Ethanol 12% (C₂H₆O)

Extraction methods:

- **Stirring Extraction.** The sample, which is formed by the skins and the solvent, standing on a beaker on a magnetic stirrer for 30 minutes at 900 rpm. A manual stirring was performed for 30 seconds each 10 minutes with a glass rod to ensure the correct homogenization of the skins.
- **Ultrasound extraction.** The sample, which is formed by the skins and the solvent, are standing on a beaker in an ultrasound equipment for 30 minutes with a water temperature less than 20 °C. A manual stirring was made for 30 seconds each 10 minutes with a glass rod to ensure the correct homogenization of the skins.

All samples follow the nomenclatures that appear in the table 1.

Código	Muestra
AA	Extraction with Water and stirring method
AU	Extraction with Water and ultrasound method
AE5A	Extraction with Water/Ethanol (5%) and stirring method
AE5U	Extraction with Water/Ethanol (5%) and ultrasound method
AE12A	Extraction with Water/Ethanol (12%) and stirring method
AE12U	Extraction with Water/Ethanol (12%) and ultrasound method

Table 1. Samples nomenclatures

Before measurements the samples were filtered with 0.45 μm pore size filter (filter-Lab MCE).

pH measure: It has been a direct measurement using a digital pH meter GLP Crison model 211.

Sugars measure: It has been used a refractometer (Model HI-96811). The measurement is expressed in Brix grade.

Antioxidant activity: It has been used analysis of DPPH (2, 2-diphenylpicrylhydrazyl) according to the method used by Alen-Ruiz *et al.* (2009).

Color analysis:

- UV-visible spectrum are obtained in the range of 250-770 nm, using water as reference. CIELAB parameters that have been determined are: a^* (red-green), b^* (yellow-blue), L^* (lightness), tonality and intensity according to the recommendations of the International Commission on Illumination (CIE, 2004). The data were calculated by software Colvin (v.1.00.04) Perkin Elmer.
- Total polyphenol rate has been study by the absorbance at 280 nm, because it is a measure of the total polyphenol content. The polyphenols compounds have an absorption maximum in that region of the spectrum.

All spectrophotometric measurements are made on a Perkin Elmer Lambda 25 using 10 mm quartz cells for all measures except for the CIELAB space. In this measure had been used 1 mm light path cells.

Tasting analysis: In the tasting panel it had made a first tasting analysis by people of the research team to discard those samples that are not relevant because they had low scent or unacceptable intensity. After, with the samples that experts selected were made a second tasting analysis according to ISO 3591-1977. In Figure 1 appear tasting panel card used for second tasting analysis.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN
fruit processing





UNIVERSIDAD
B.
CORDOBA

Tasting Panel Table

Nombre: _____ Fecha: _____

Edad: _____

Olfactory Exam

You value the samples attributes

Samples U Y A

First Impression

Unpleasant					Pleasant
------------	--	--	--	--	----------

Intensity

Weak					Powerful
------	--	--	--	--	----------

Scents

<i>Floral</i>					
<i>Herbaceous</i>					
<i>Fruity</i>					
<i>Spicy</i>					
<i>Chemical</i>					
<i>Caramelized</i>					

Weak					Powerful

Figure 1. Tasting panel card

RESULTS AND DISCUSSION

For the use of raisin compressed wastes extracts as natural additives and for the study of their healthy properties, it started with the characterization of the pH. In Figure 2 (left), we can see that pH value is similar in all samples. This is around pH 3.5-3.8 and is considered a normal pH for this type of fruit. Grapes are fruits in which found acids, mainly tartaric acids, and they cause this pH. The most notable is that in the Water/Ethanol (5%) sample by stirring (AE5A) and ultrasound method (AE5U) has an average pH lower in compared to the other two samples. While the pH average value is similar in Water/Ethanol sample (12%) (AE12) and Water sample (A). Also, by stirring extraction method the three samples has got a higher average pH value than the samples extracted by the ultrasound method.

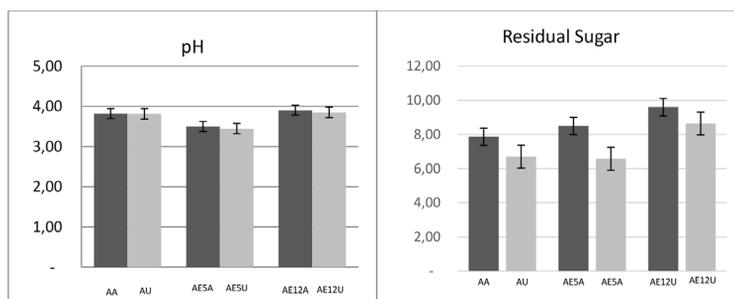


Figure 2. pH value (left) and residual sugar (Right) in samples of Water, Water/Ethanol (5%) and Water/Ethanol (12%) by extraction with stirring and ultrasound method.

Figure 2 (left) shows residual sugars in the samples. In general, more residual sugars of the skins are extracted by stirring method. A higher extraction is achieved with Water/Ethanol (12%) solution (AE12). This sample could be contaminated easier by microorganisms because it has a higher value in residual sugars. However, this sample contain 12% of ethanol and due to it could exist a higher stress to the successful development of microorganisms. For this, the Water extract (A) could be contaminated easier because it contains residual sugars sufficient for microbial growth.

The study of polyphenols is very important because they are reducing agents that protect the tissues against oxidative stress and associated diseases such as cancer, heart disease and inflammation (Tapiero *et al.*, 2002). Figure 3 shows the mean absorbance at 280 nm of the samples as rate of total polyphenols content. The polyphenols have a maximum absorption at that wavelength. The absorbance of the extraction is higher in the sample extracted with Water/Ethanol (5%). The sample extracted by stirring method (AE5A) is considered best to be used in the pharmaceutical and food industries

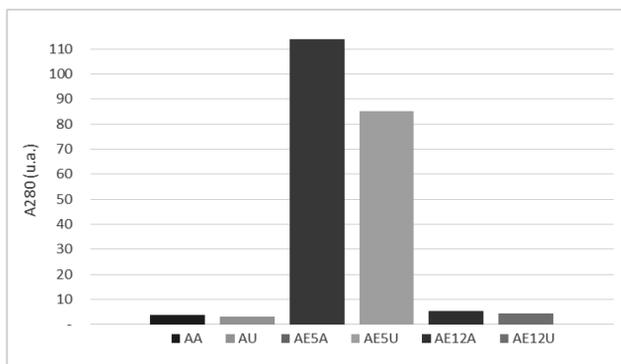


Figure 3. Absorbance at 280 nm of the samples obtained in the extractions

Order to analyze the color of the samples was studied intensity and tonality of extracts. The color intensity is measured by the sum of the absorbance for a thickness of 1 mm, correspond to wavelengths of 420 and 520nm, coinciding with the yellow-brown color and red color, respectively. Red wines have an absorption maximum at 520 nm. At this wavelength it is where the maximum extraction of anthocyanins, which are responsible for the red color of musts and wines. This is important from the point of view for using the skins extracts as food additives. In Figure 4 (left) the extraction have a higher intensity is made with Water/Ethanol (5%) by the stirring method (AE5A). This is followed by extract of ultrasound method (AE5U), so both have higher red tones coloration. This can be useful for use them as natural colorants in food industry. The others extractions have a very low intensity.

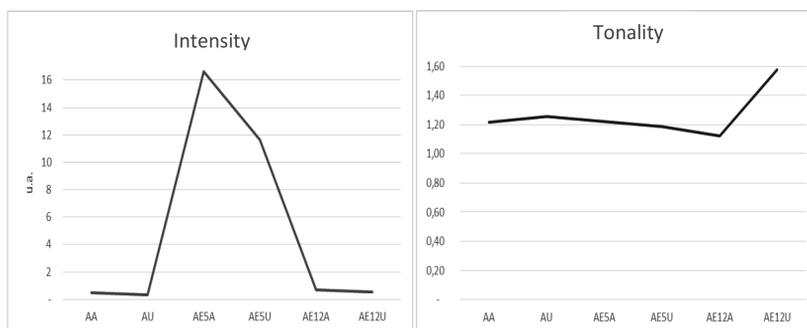


Figure 4. Intensity (Left) and tonality (Right) values of the samples

The tonality was measured by the relation of the absorbance for a thickness of 1 mm, corresponding to the wavelengths 420 and 520 nm, and these coinciding with the yellow-brown and red color, respectively. In Figure 4 (right) all samples have a yellow tonality. The sample made by ultrasounds method with Water/Ethanol (12%) as extractant (AE12U) is that offers a higher tonality.

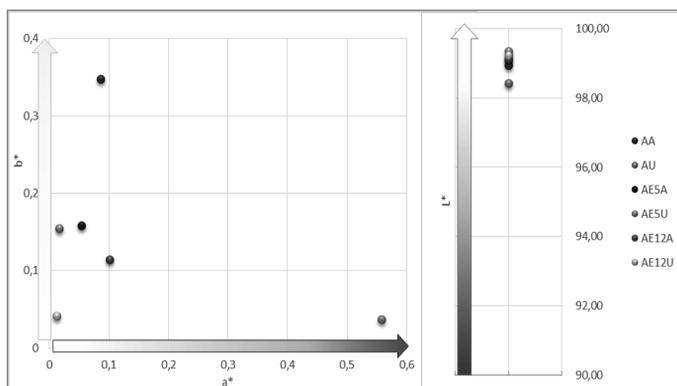


Figure 5. CIELAB space of extractions

Another measure to analyse the colour is studying CIELAB space. In Figure 5 is shown the color parameters of different skins extractions by the CIELAB space. This is represented by a*- b* color plane and a vertical axis that represents the lightness L*. The a* axis defines the color

change that occurs between green (-a*) and red (+a*). The b* axis defines the color variation between blue (-b *) and yellow (+ b *).

The chart 6 shows that the values of the parameters a^* and b^* in the majority of the samples are positioned close to 0, and they have an orange-red color. AA and UA samples are stand out. AA sample has a more orange color, while the AU is more red color. For lightness (L^*) we find that the values of the samples are placed very close to 100 (pure white), so they are very light, nearly transparent. We should not forget that these extractions are from samples of skins, so the must extracted for winemaking process has taken most of the substances that give color to this.

The extracts present a yellowish-reddish colour with certain intensity and tonality, because the results of this colour analysis can be possible that the extracts contain antioxidant compounds. The antioxidants are chemicals compounds that are characterized by delay oxidation of various substances, mainly fatty acids, whose reactions occur in food and in the human organism. The fatty acids can cause significant physiological changes and these are set off various chronic diseases, including some cancers and heart disease. Therefore, it is very important to consume foods with a high content in antioxidants (Zamora, 2009). So, an analysis of antioxidant activity was made. The results were expressed in millimoles per liter Trolox equivalent (mmol TE/L) and they are shown in Figure 6.

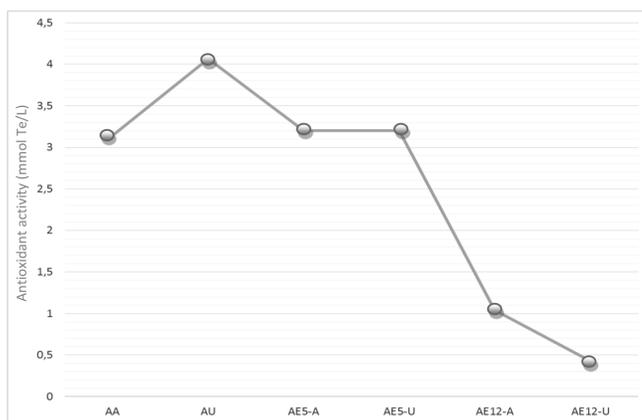


Figure 6. Antioxidant activity of samples

It can be observed as the antioxidant activity decreases while the ethanol concentration increases to 12%. Thereby it is obtained higher extraction of antioxidant compounds using water as the extractant. Between the two methods, the best of them is ultrasound method. So, this is considered the best option for use by-products of raisin wastes as a nutritional supplement for fortified foods.

In order to characterize the scent of samples have made a previous tasting in which the tasters evaluated the aromatic characteristics of the 6 samples (3 formed by

extraction with stirring method and another 3 with ultrasound method), whose extractants were Water, Water/Ethanol (5%) and Water/Ethanol (12%). Respectively, the Water samples (AA-AU) were discarded due to present an aromatic intensity low and an unpleasant aroma and Water/Ethanol (12%) samples (AE12A-AE12U) for present a very alcohol intense aroma.

After, it has made a second tasting of experts was done with the two samples of Water/Ethanol (5%) (AE5A-AE5U) because they possessed a more pleasant and intense aroma. The tasters describe details in a range of 1-5 for the first impression of the sample U (extraction with ultrasound) and sample A (stirring extraction), intensity and the aromas (floral, herbaceous, fruity, spicy, chemical and caramelized) that they appreciate and the degree in which appear.

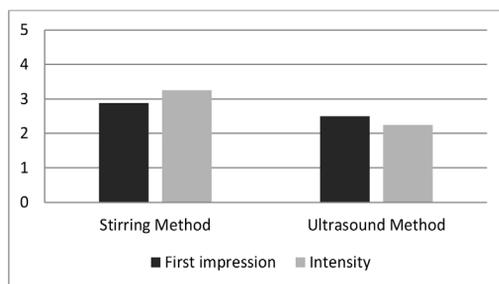


Figure 7. First impression and intensity in Water/Ethanol (5%) sample by extraction with ultrasound and stirring method.

In Figure 7, for both samples the first impression was pleasant. The sample extracted by stirring method stands out because it was more pleasant for tasters. For aromatic intensity, the two samples had an average grade, although the sample extracted by stirring method had a higher intensity. So it is better from this point of view to be used in the food industry. This study is about extracts of skins, therefore intensity and first impression can not be compared with the results which would be obtained in a wine or must tasting.

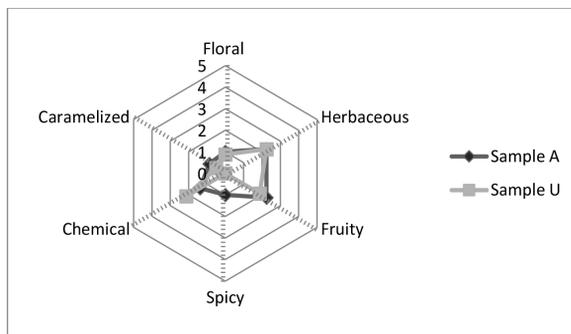


Figure 8. Aromatic descriptors in Water/Ethanol (5%) samples by ultrasound and stirring method.

Figure 8 shows the type of aromatic descriptors and the level that these appear in the skins extracts extracted with Water/Ethanol (5%) by ultrasound and stirring method (AE5U-AE5A). The best sample to be used in the area of pharmaceutical and/or food industry is Sample A (stirring extraction) for having a higher variety of scents and be more pleasant to tasters. The tasters described that this had caramelized, spicy and fruity aromatic notes. While the sample U (ultrasonic extraction) had an accented chemical scent, this is possibly because ethanol used in the extraction.

In conclusions, the results have shown that with Water/Ethanol (5%) solvent are obtained extracts with higher content of polyphenols and antioxidants compounds, better colouring properties and an aromatic profile more complex and pleasant. The extraction method can vary depending on the final use of the extracts. Although the stirring method stands out for it extracts more polyphenols and presents better levels in the color and aromas analysis. For the antioxidant activity both methods achieved the same extraction. However, further investigation is necessary for improving the method of valuation as a natural additive.

BIBLIOGRAPHY

- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, M. C., Martínez-Carballo, E., Simal- Gándara, J., 2009. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.*, 113: 53-60
- Anastas, P. T., Warner, J.C., 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Ed. Oxford University Press.
- Márquez, A., Serratos M. P., López-Toledano, A., Mérida, J., 2011. Colour and phenolic compounds in sweet red wines from Merlot and Tempranillo grapes chamber-dried under controlled conditions. *Food Chem.*, 130: 111-120.
- Serratos, M. P., Márquez, A., López-Toledano, A., Mérida J., 2011. *Sensory Analysis of Sweet*

- Musts in Pedro Ximenez cv. Grapes Dried using Different Methods. *Journal of Enology & Viticulture*, 33: 1-14.
- Tapiero, H., Tew, KD, Nguyen Ba, G. una ,Mathé, G. 2002. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 56 (5): 215-222.
- Zamora, J. 2009. Antioxidants: Micronutrients fighting for health. *Rev. Chil. Nutr.*, 34 (1): <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>

QUANTIFICATION OF CALCIUM IN SPARKLING WINES BY INFRARED SPECTROSCOPY

Joana. VESTIA¹; Maria I. ROUXINOL¹; Helena FERREIRA²; Ana E. RATO¹; M. Rosário MARTINS; Sara RODRIGUES; João M. BARROSO¹

1. INTRODUCTION

Wine is a complex matrix, besides water and alcohol contains a great variety of inorganic and organic components, such as sugars, organic acids, phenolic compounds, amino acids, metal elements, anthocyanins and non-coloured phenolic compounds (Jackson, 2008; Sperkova & Suchanek, 2005). The composition of wine is due to many factors related to the specific elements, such as, anthocyanins and non-coloured phenolic compounds, production area, grape variety, soil, climate, winemaking practices, transport and storage (Magalhães, 2008; Ribéreau-Gayon, et al., 2006; White,

2015). All these elements have a crucial influence on quality and flavour of wine products (Zoecklein, *et al.*, 2012). Particularly the amount of mineral elements in wine is believed to be of great interest, mainly due to their influence on wine technology as well as toxic effects (Jos et al., 2004; Likar et al., 2015).

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

The yeast immobilization technique in calcium alginate is widely used in the food industry due to its high capacity of retention and preservation of cell viability (Velings & Mestdagh, 1995). The alginate is cheap, non-toxic, forms a highly versatile array and protects the active components from heat and moisture, thus increasing its stability and bioavailability (Funami et al., 2009), and meets the following requirements: non-degradable, availability, low cost and that is suitable for pH and low temperature (Torresi *et al.*, 2011). However, the use of encapsulated yeast in the base wine needs certain requirements. These yeasts should not be used in wine with a calcium content higher than 80 mg/L to avoid aggregation of alginate capsules due to calcium ion.

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

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

However, a significant proportion of the wine in *Adega Cooperativa de Borba* contains a higher concentration of calcium, causing aggregation of alginate beads that will form a larger and less flexible structure. When fermentation and maturation is completely, is necessary to remove the alginate capsules. The aggregation of alginate beads will difficult the 'dégorgement' task. Due to elevated pressure inside the bottle the aggregate formation frozen before 'dégorgement' and get waste within the bottle, leaving the wine able to be merchantable, unless filtered. Filtration is a process that is costly, since it would require a new bottle, stopper and wine will lose some pressure and organoleptic qualities. To prevent this, it is necessary to know the calcium content in the base wine. The main goal of this research is to implement a fast and accurate method to evaluate the calcium content in wine.

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

Chemometrics is crucial for interpretation of spectroscopic data and refers to a vast field of statistical and mathematical techniques that are used to extract relevant information from primary chemical or analytical measurements. (Chau *et al.*, 2004; Martini, 2013). With chemometric calibrations, it is possible to determined the relationships between instrumental and laboratory measurements. Partial Least Squares Regression (PLSR) was the main tool applied to the full spectrum (1100–2300 nm, 1201 variables) (Wold *et al.*, 2001; Wold *et al.*, 2001). Cross-validation is the most popular method to optimize the number of factors of the model and to avoid the problem of over-fitting.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Reagents/Chemicals

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

2.2. Wine samples

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

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

Table 1- Characterization of the analysed wine

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

2.3.Experimental design

All material and containers were glassware. Containers and all material used for storing and treating the samples were cleaned by soaking them in a 10% (v/v) HNO₃ solution for at least 24 h and rinsed abundantly with ultrapure water before use.

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

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

2.3.1 Determination of minerals

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

Table 2. Optimum operating conditions for AAS.

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

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

2.4. Analytical techniques

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

2.5. NIR spectra collection

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

2.6. Near infrared spectroscopy analysis and chemometrics

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

Multiplicative signal correction (MSC) was tested for variations in light scattering. The first derivative was calculated because it is useful for extracting band-shift and band- shape features and in eliminating baseline effects. The influence of smoothing using

Savitzky–Golay (SG) and baseline correction was also tested. Finally, prior to calibration, we used the SG and first derivatives to smooth the noisy spectra of Reflectance.

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

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

3. RESULTS AND DISCUSSION

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

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

3.1. Figures of merit

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

Table 3. Figures of merit of the method.

R₂	0,999
Limit of detection	0,15 mg/L
Limit of quantification	0,45 mg/L
Precision	99,15%
% Recovery	98,13%

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

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

3.2. Calibration

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

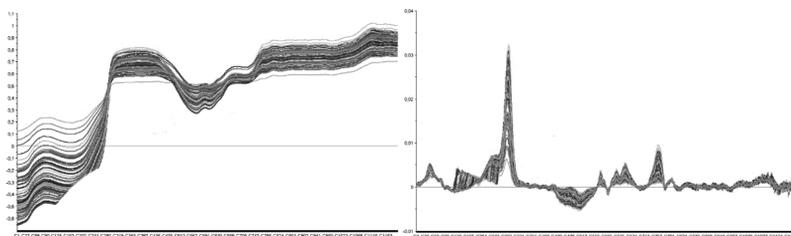


Figure 1-shows the spectra of all samples and the spectra with Savitzky-Golay (SG) and baseline correction.

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

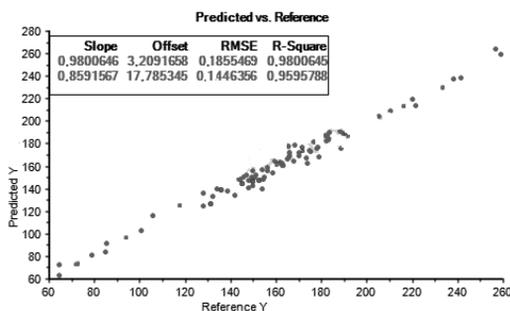


Figure 2- shows the correlation of the values obtained in the laboratory with respect to those predicted by NIR for calcium.

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

Slope	0,980
Offset	3,209
RMSEC	0,186
RMSECV	0.146
R_2	0,980
BIAS	0,002

Table 4- shows the results obtained for calibration

3.3.External validation

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

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

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

4. CONCLUSIONS

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

Calcium values obtained by the AAE, in the studied wines, range between 64.69 and

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

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

The objective was to establish a rapid, high-throughput and low-cost analytical method to monitoring wine quality in second fermentation of sparkling wine. The

results confirmed the ability of NIR-AOTF to predict calcium content, because the value of coefficient correlation is high and the value of RMSE and BIAS is low.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank *Adega Cooperativa de Borba* winery for providing white wine samples, *Laboratório da Água* of *Universidade de Évora* for the analysis on the AAS equipment and *Laboratório de Tecnologia e Póscolheita* of *Universidade de Évora* for technical support with wine analysis.

REFERENCES

- Chau, F.-T., Liang, Y.-Z., Gao, J., & Shao, X.-G. (2004). *Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755.
- Gauglitz, Günter and Vo-Dinh, T. (Ed.). (2003). *Handbook of Spectroscopy*. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA.
- Giovenzana, V., Civelli, R., Beghi, R., Oberti, R., & Guidetti, R. (2015). Testing of a simplified LED based vis/NIR system for rapid ripeness evaluation of white grape (*Vitis vinifera* L.) for Franciacorta wine. *Talanta*, 144, 584–91.
- Kemps, B., Leon, L., Best, S., De Baerdemaeker, J., & De Ketelaere, B. (2010). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 105(4), 507–513.
- Martelo-Vidal, M. J., & Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158, 28–34. Martini, F. (Ed.). (2013). *Chemometrics in Food Chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Sauvage, L., Frank, D., Stearne, J., & Millikan, M. B. (2002). Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach. *Analytica Chimica Acta*, 458, 223–230.
- Sun, D.-W., & Dufour, É. (2009). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier.
- Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129(3), 1232–1241.
- Velings, N. M., & Mestdagh, M. M. (1995). Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*, 3(3), 311–330.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2)
- Wold, S., Trygg, J., Berglund, A., & Antti, H. (2001). Some recent developments in PLS modeling. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 58, 131–150.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & S., F. N. (2012). *Production Wine Analysis*. Springer Science & Business Media.

SENSORY DESCRIPTIVE ANALYSIS (QDA) OF VITIS VINÍFERA PARDINA WINES. EFFECT OF THE ADDITION OF HOLM OAK (QUERCUS ILEX) CHIPS.

Esther Gamero¹; Lucía Aguilar¹; Mar Vilanova³; Inmaculada Talaverano¹; Daniel Moreno¹; Manuel A. Martínez² y M. Esperanza Valdés¹.

Summary

The *Vitis vinifera* L. cv. Pardina is indigenous to the region of Extremadura (Spain) where it is widely

cultivated, especially in Tierra de Barros wine production area. The aim of this work is to establish the sensory descriptors of young wines made from the cv. Pardina, from Extremadura (Spain). For this purpose, the quantitative descriptive analysis (QDA) in varietal wines from this cultivar has been used.

The wines were characterized by low intensity of color, and their tonalities were yellow steely, pale yellow and yellow with grey or green hues. In the olfactive phase Pardina wines the descriptors identified were fruity aromas (green apple, banana, pear and pineapple) and in the taste sensorial phase by the descriptors balanced and freshness. After descriptors identifying, incidence of holm oak chips (*Quercus ilex*) over sensory profile of the wines made from the same variety was studied. The results showed that the presence of chips did not affect significantly to the taste and visual sensorial phases of wines. Nevertheless, the aroma profile was modified, highlighting the aromas provided by the wood, but without masking the initial aroma of wines.

Key words: Sensory analysis, Extremadura white cultivar, aromatization

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de madera en enología, generalmente en forma de bodega, es una práctica muy habitual en la crianza de vinos. La madera modifica las características físico-químicas del vino y como consecuencia sus características organolépticas, aportando un aroma complejo y una mejor sensación bucal en el vino (MARTÍNEZ, 2006). Sin

¹ CICYTEX-Technological Institute of Food and Agriculture-INTAEX (Government of Extremadura), Av. Adolfo Suárez s/n, 06071 Badajoz, Spain

² CICYTEX- Institute of Cork, Wood and Charcoal IPROCOR Polígono Industrial El Prado, S/N,06800 Mérida (Badajoz), Spain

³ Spanish National Research Council (CSIC) Misión Biológica de Galicia (MBG) El Palacio-Salcedo. 36143. Pontevedra. SPAIN

embargo, el uso de barricas está condicionado por factores tales como la vida útil de las barricas, la disponibilidad de espacio para su almacenamiento, la movilidad de grandes cantidades de vino en volúmenes pequeños, el coste económico que esto conlleva y las limitaciones en la producción anual de barricas de madera. Como solución a estos inconvenientes y con el fin de minimizar costes, se han diseñado métodos de envejecimiento acelerado, que imitan el proceso que tiene lugar en las barricas, usando diferentes tipos de fragmentos (virutas, granulados, dados, raspaduras, etc.) (CHATONNET, 2007). En los últimos años, se ha popularizado la adición al vino de fragmentos de madera en diferentes momentos de la vinificación, siendo la alternativa más generalizada el empleo de virutas (MARTINS *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012). Se sabe que el aporte de virutas tiene un papel importante sobre el color, el dulzor y la estructura del vino, así como sobre el ajuste aromático y la complejidad del vino, principalmente en vinos tintos (CASASSA *et al.*, 2008). Sin embargo, son pocos los estudios efectuados en vinos blancos (PÉREZ-COELLO *et al.*, 2000; VALDÉS *et al.*, 2010). Los estudios realizados por diferentes autores sobre el impacto de madera de diferente procedencia en los vinos, concluyen que cada madera tiene un perfil y por tanto el impacto sensorial de cada una de ellas es diferente. Dado que para la elaboración de virutas, los requisitos que debe cumplir la madera son menores que para la elaboración de barricas, en la actualidad diferentes grupos analizan las posibilidades enológicas de maderas de diferentes especies (CABRITA *et al.*, 2012). Sin embargo, aún no se tienen noticias de la composición volátil de la madera de encina (*Quercus ilex*) y del impacto de este tipo de madera en los vinos.

Las descripciones sensoriales son de máximo interés para conseguir situar objetivamente productos en el mercado; asimismo, para lograr una caracterización, es necesario disponer de técnicas de evaluación objetivas y reproducibles de las características del producto. El análisis descriptivo sensorial, es el método más sensible utilizado en el análisis sensorial, para la caracterización del producto. Consiste en describir las diferentes sensaciones que el vino provoca, asignándoles términos previamente establecidos y fácilmente reconocibles por el público, llamados descriptores. Un descriptor sensorial es un término con el que un juez identifica un aspecto de la percepción del producto. Entre las técnicas de análisis descriptivo el Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA), en la actualidad se ha convertido en una de las herramientas más completas en el análisis sensorial. En este análisis se seleccionan los atributos que mejor describen la muestra y posteriormente se cuantifican dichos atributos (VILANOVA *et al.*, 2009). Los datos resultantes pueden ser evaluados mediante análisis de varianza y técnicas estadísticas multivariantes y luego representados gráficamente. Los métodos de análisis sensorial se han utilizado para caracterizar diferentes vinos monovarietales como Chardonnay (OHKUBO *et al.*, 1987), Semillon y Sauvignon blanc (FRANCIS *et al.*, 1992), Touriga Nacional (FALQUÉ *et al.*, 2004) y para estudiar el impacto de las técnicas enológicas en la propiedades sensoriales de los vinos (JACKSON, 2009).

Este trabajo engloba de dos de las líneas de investigación que actualmente se desarrollan en el Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX). Por un lado, el establecimiento de los perfiles sensoriales de variedades típicas extremeñas y alentejanas, y por otro el empleo enológico de madera de encina y otras especies típicas de las dehesas extremeñas. De modo que los objetivos de este estudio

fueron: elaborar el perfil sensorial del vino de la variedad de uva Pardina e identificar las modificaciones más importantes que se producen debido a la conservación de los vinos en presencia de virutas de encina (*Quercus ilex*).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- Establecimiento del perfil sensorial de la variedad cv. Pardina

A fin de establecer los atributos descriptores de la cv pardina, se cataron vinos monovarietales elaborados diferentes zonas de la D.O. Ribera del Guadiana a partir de variedades típicas cultivadas en Extremadura. El panel de catadores estuvo compuesto por expertos catadores, todos ellos relacionados con el mundo del vino (investigadores, productores y técnicos). Todos los vinos catados se sirvieron en copas de cristal normalizadas en un volumen de 30 mL para cada vino a 12°C según la norma ISO 3591 (1977). Para cada vino, cada uno de los catadores propuso descriptores visuales, olfativos y gustativos que puntuó de 1 a 10 en función de la intensidad con que eran percibidos. Para conocer la importancia de los descriptores y representar la respuesta del panel, se calcularon las frecuencias ajustadas (F) y las intensidades relativas (I) de cada descriptor. Con ambos índices se calculó la media geométrica (GM) de la siguiente forma:

$x I \cdot F$ (%) es el número de veces que se menciona un descriptor expresado en % e I (%) es la suma de intensidades dadas por el panel para un descriptor sobre el máximo posible de intensidad para ese descriptor expresado en %. Este método hace posible tener en cuenta descriptores que raramente son mencionados pero que son muy importantes en términos de intensidad percibida y descriptores con baja intensidad pero que son mencionados muy a menudo. (Dravnieks and Bock 1978). Se determinó emplear como criterio de selección de descriptores, aquellos cuyas media geométrica era superior a 10, lo que permitió eliminar una serie de descriptores que medias geométricas fueron relativamente bajas. La hoja de cata se realizó con los descriptores cuya $GM > 10\%$ (Vilanova *et al.* 2012). Además, para este trabajo, se incluyeron en la fase olfativa, otros atributos hallados habitualmente en vinos que han estado en contacto con madera (Ahumado, Café, Frutos secos, olor a madera).

2.2. Aromatizaciones de los vinos:

Para este estudio se han empleado un total de 10 vinos monovarietales cv. Pardina, de los cuales cinco de ellos se almacenaron durante cuatro meses en depósitos de acero inoxidable de 5L a 18°C en presencia de virutas *Quercus Ilex* (cedidas por Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal, IPROCOR) con una dosis de 5g/L (VP) y otros cinco permanecieron en las mismas condiciones pero sin virutas, considerados testigo (TP). Transcurrido este período de tiempo, se retiraron las virutas de los depósitos, se embotellaron todos los vinos y permanecieron en botella durante 6 semanas. Finalmente, en la semana 22, en los vinos embotellados se procedió al análisis sensorial.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Elaboración del perfil sensorial

Se generaron un total de 61 descriptores para la variedad Pardina, 17 términos de fase visual, 32 términos de fase olfativa y 12 de gustativa.

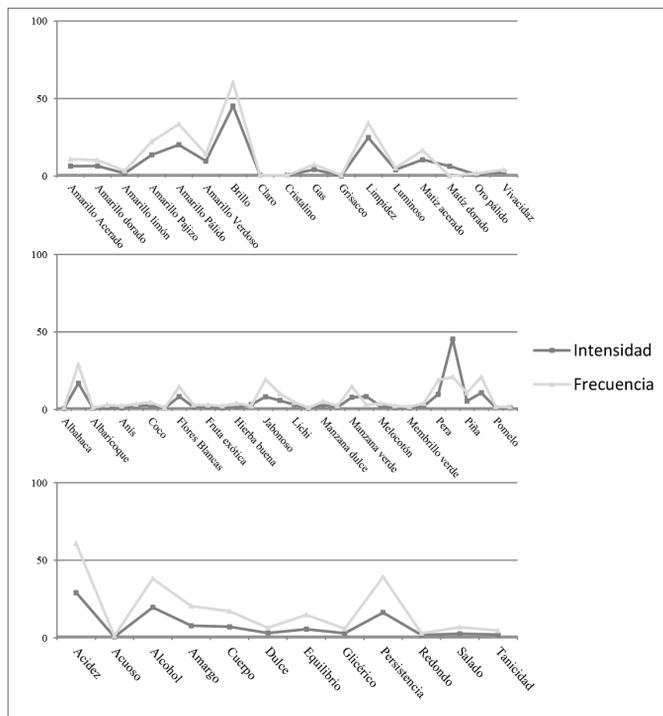


Figura 1. (%) Intensidad y (%) Frecuencia para los descriptores aromáticos obtenidos por QDA para los vinos cv. Pardina.

La **Figura 1** muestra la relación frecuencia (%) intensidad (%) de descriptores obtenidos para los vinos catados. Los atributos más frecuentes fueron calculados como el número de veces que el descriptor se menciona sobre el número total de veces que es posible mencionarlo, expresado como un porcentaje. Según esta figura, en lo que respecta a la fase visual, las tonalidades de los vinos fueron de los amarillos acerados (vinos con reflejos grisáceos de acero inoxidable), a los amarillos pajizo o pálido, con matices grisáceos o verdosos, y en ellos aparecieron principalmente aromas frutales, (manzana verde, plátano, pera y piña) sin destacar ninguno de ellos sobre los restantes. En lo que respecta a la fase gustativa, el descriptor alcohólico tuvo una intensidad superior a la deseable por los catadores.

La **Figura 2** proporciona la hoja de cata elaborada con el listado de descriptores de los vinos blancos extremeños con GM>10. Además, y de forma consensuada, los catadores decidieron también incluir en la hoja de cata el descriptor “Matiz amarillo verdoso” para la ase visual y el término “herbáceo” para la olfativa.

Figura 2. Ficha de cata para el estudio sensorial de los vinos cv. Pardina conservados con virutas.

Vino	Intensidad del Atributo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FASE VISUAL										
Amarillo acerado										
Amarillo pálido										
Amarillo verdoso										
Amarillo dorado										
Matiz amarillo grisáceo										
Matiz amarillo verdoso										
Limpidez										
Brillo										
FASE OLFATIVA										
Manzana verde										
Plátano										
Pera										
Albaricoque										
Flores blancas										
Jabonoso										
Piña										
Herbáceo										
Especiados										
Maderas: pino, cedro, roble...										
Ahumado										
Café										
Frutos secos										
FASE GUSTATIVA										
Alcohol										
Acidez										
Cuerpo										
Amargo										
Persistencia										

3.2. Incidencia sensorial de la presencia de virutas.

Una vez elaborada la ficha de cata, se procedió al análisis sensorial de los vinos con virutas (VP), y los vinos testigo (TP). Cada vino se cató por triplicado en días diferentes. Los resultados obtenidos, se muestran en la **Figura 3**, donde se expresan las medias obtenidas a partir del juicio de los catadores. Se puede apreciar que las virutas no alteraron la limpidez ni el brillo de los vinos. El análisis sensorial indicó que la presencia de virutas no evitó en su totalidad la oxidación de los vinos cv. Pardina, ya que independientemente de la presencia de virutas, los catadores hallaron tonalidades típicas de vinos evolucionadas (amarillo dorado).

En lo que a la fase olfativa se refiere, se encontró que en los vinos cv. Pardina predominaron los descriptores “plátano”, “piña” y “pera”, por lo que únicamente se detallan los resultados de estos descriptores, observándose que entre ellos, el descriptor “pera” fue el más intensamente percibido. En el caso de los vinos en contacto con virutas (VP), estos descriptores se detectaron con menos intensidad. Asimismo, se halló en los vinos el descriptor “frutos secos”, probablemente asociado a la presencia de acetaldehído. Este compuesto procedente de la oxidación, se percibió con mayor intensidad en los vinos

cv. Pardina en ausencia de virutas (TP), lo cual podría significar que si bien no totalmente, sí en cierta medida, las virutas protegieron a los vinos de la oxidación. En la **Figura 3**, también se observó un desplazamiento hacia la izquierda de las gráficas del vino en contacto con virutas (VP), ya que en esta zona de la figura están representados los descriptores de los aromas cedidos por las virutas, “madera”, “ahumado” y “café”. Es de destacar, la presencia de aromas ahumados, que fueron señalados como desagradables por los catadores, lo cual corrobora que las virutas sufrieron un excesivo tostado.

En cuanto a la fase gustativa, se observó que la presencia de virutas (VP) no afectó al cuerpo de los vinos, debido probablemente al elevado extracto seco de los vinos. Tampoco se percibió que las virutas afectaran la acidez ni a la persistencia. Sin embargo, sí incidieron en el sabor amargo, que se percibió con mayor intensidad en los vinos en presencia de virutas (VP), lo cual está asociado también al excesivo tostado de éstas como ya se indicó anteriormente. Es de destacar que en los vinos VP, se percibió menos el alcohol. Esto pudo ser debido a que las virutas aportaron compuestos aromáticos a estos vinos haciendo que el alcohol se percibiera con menos intensidad, ya que la conservación de vinos en presencia de virutas no incide en la graduación alcohólica de los mismos.

4. CONCLUSIONES

Las virutas de encina aportaron ciertos componentes aromáticos que dieron una mayor complejidad aromática a los vinos, especialmente en el caso de cv. Pardina, que mejoraron a los almacenados en ausencia de virutas. Las virutas proporcionaron especialmente aromas tostados y ahumados a los vinos, debido probablemente a que el tostado de las mismas no fue del todo el adecuado para este tipo de madera. En base a todo esto, las virutas de encina pueden constituir una buena herramienta enológica, ya que con su empleo las bodegas podrían, de forma fácil y sencilla, ampliar la gama de vinos elaborados a partir de estas variedades, especialmente en el caso de cv. Pardina.

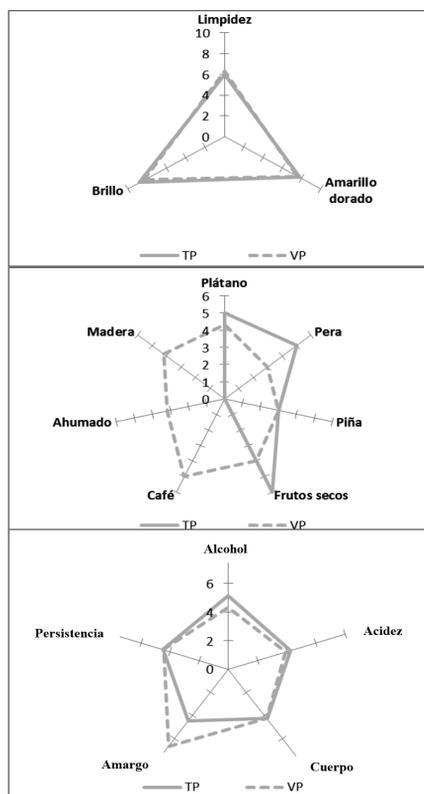


Figura 3. Perfil sensorial de los vinos cv. Pardina conservados en ausencia y presencia de virutas de encinas *Quercus Ilex* .

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto RITECA, Red de Investigación Transfronteriza de Extremadura, Centro y Alentejo, está cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo de Cooperación Transfronteriza España-Portugal (POCTEP) 2007-2013.

BIBLIOGRAFÍA

- Cabrita, M.J.; García, R.; Martins, N.; Gomes da Silva, M.; Costa-Freitas, A.M. (2012). Gas chromatography in the analysis of compounds released from wood into wine. *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 185–208. ISBN: 978–953–51–0298–4.
- Casassa, F.; Sari, S.; Avagnina, S.; Díaz, M.; Catania, C. (2008). Efecto del empleo de chips de roble y del tipo de tostado sobre la composición polifenólica y las características cromáticas y organolépticas de vinos Merlot. *Enología*, 2, 1–17.
- Chatonnet, P. (2007). Productos alternativos a la crianza en barrica de los vinos. Influencia de los parámetros de fabricación y de uso. *Enología*, 3, 1–24
- Falqué, E., Ferreira, A.C., Hogg, T. & Guedes-Pinho, P., 2004. Determination of aromatic descriptors of Touriga Nacional wines by sensory descriptive analysis. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 298-302.
- Francis I.L., Sefton M.A. Williams P.J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolyzed precursor fractions from Semillon, Chardonnay and Sauvignon Blanc grape juices. *J. Sci. Food Agric.* 59, 511-520.
- Jackson, R. S. (2009), “Wine tasting: a professional handbook“, Academic press, San Diego, p. 10; 174-175 and 267.
- Martínez, J. (2006). Incidencia del origen del roble en la crianza de los vinos de Rioja. Gobierno de La Rioja. ISBN: 84–8125–265–4.
- NORMA ISO 3591 (1977). *Sensory analysis. Apparatus Wine Tasting Glass*.
- NORMA ISO 8589 (1988). *Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms*.
- Ohkubo, T., Noble, A.C. and Ough, C.S. (1987). Evaluation of Californian Chardonnay wines by sensory and chemical analyses. *Sci. Aliments* 7, 573-587.
- Pérez-Coello, M.S.; Sánchez, M.A.; García, E.; González-Vinas, M.A.; Sández, J.; Cabezedo, M.D. (2000). Fermentation of white wines in the presence of wood chips of American and French oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 885–889.
- Soares, B.; García, R.; Costa-Freitas, A.M.; Cabrita, M.J. (2012). Phenolic compounds released from oak, cherry, chestnut and robinia chips into a synthetic wine: Influence of toasting level. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 27, 17–26.
- Valdés, E.; Talaverano, I.; Gamero, E.; Manzano, R.; Moreno, D. (2010). Empleo de materiales alternativos de distinta procedencia en elaboraciones de cv. Pardina: Características físico- químicas, polifenólicas y atributos cromáticos de los vinos elaborados. VII Foro Mundial del Vino. Vilanova, M; Masa, A; Tardaguila, J. (2009) Evaluation of the aroma descriptors variability in Spanish grape cultivars by a quantitative descriptive analysis. *Euphytica*, Springer