



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Impacto do envelhecimento nas características físico-químicas de vinhos: o caso particular do envelhecimento de vinhos engarrafados mergulhados em profundidade

Alexandra Isabel Conchinha Freire

Orientador(es) | Maria João Cabrita

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Impacto do envelhecimento nas características físico-químicas de vinhos: o caso particular do envelhecimento de vinhos engarrafados mergulhados em profundidade

Alexandra Isabel Conchinha Freire

Orientador(es) | Maria João Cabrita

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | João Manuel Barroso (Universidade de Évora)

Vogais | Maria João Cabrita (Universidade de Évora) (Orientador)
Raquel Marta Garcia (Universidade de Évora) (Arguente)

Dedicatória

À minha família, e a todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação não seria possível sem a colaboração, estímulo e compreensão de diversas pessoas.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria João de Bastos Cabrita, toda a disponibilidade, simpatia, transmissão de conhecimento científico e motivação.

Ao Nuno Martins e ao Rui Bicho, pela simpatia, paciência, colaboração e tempo disponibilizado.

Agradecer à Herdade Canal Caveira, por ter fornecido os vinhos que foram analisados neste estudo.

À Universidade de Évora pela instituição que é, e a todos os professores do Mestrado de Viticultura e Enologia, pela partilha de conhecimento, disponibilidade e amabilidade.

Aos meus colegas de mestrado pela amizade, partilha de conhecimento e por todos os bons momentos que vivenciamos ao longo destes anos.

Um especial agradecimento ao Grupo Parras, pelo apoio, incentivo e flexibilidade horária, só assim foi possível a realização desta tese.

Aos meus colegas de trabalho, por toda a amizade, ajuda e paciência.

À minha família, principalmente aos meus pais e avó, pela compreensão e apoio ao longo do meu percurso académico, foram eles que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir os meus sonhos.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus amigos por todo o carinho, amizade e por estarem sempre lá.

A todos um Muito Obrigada!

Resumo

Impacto do envelhecimento nas características físico-químicas de vinhos: o caso particular do envelhecimento de vinhos engarrafados mergulhados em profundidade

Atualmente, assistimos à prática de envelhecer garrafas de vinho em profundidade, mergulhadas no mar ou em albufeiras, porém até ao momento, poucos dados são conhecidos acerca do impacto do envelhecimento em profundidade nos vinhos.

Este trabalho tem como objetivo, avaliar o impacto desta prática nas características físico-químicas, verificar alterações na composição volátil e ao nível da cor em vinhos engarrafados e posteriormente mergulhados em profundidade.

Os compostos fenólicos e colorimétricos foram determinados por espectrofotometria UV-VIS. Os compostos voláteis foram identificados por extração LLE e HS-SPME - GC/TOFMS.

Relativamente à cor, a intensidade e a tonalidade não sofreram qualquer alteração significativa. Verificou-se uma diminuição no teor em flavonóides totais e não antociânicos e um aumento no índice de polifenóis totais, antocianinas livres e totais. Apesar de algumas alterações ao nível da composição volátil, os resultados não são suficientes para inferir conclusões.

Palavras-chave: vinhos; envelhecimento; aroma; cor; profundidade

Abstract

Impact of ageing on wine characteristics: the case of bottled wines submerged in deep water

Currently, we witness the practice of ageing wine bottles in depth, immersed in the sea or in reservoirs, but so far, little data is known about the impact of ageing in depth on wines.

This work aims to evaluate the impact of this practice on the physicochemical characteristics, verify changes in the volatile composition and in terms of color in wines bottled and subsequently immersed in depth.

Phenolic and colorimetric compounds were determined by UV-VIS spectrophotometry. Volatile compounds were identified by LLE and HS-SPME - GC/TOFMS extraction.

Regarding color, intensity and tonality did not undergo any significant change. There was a decrease in the content of total and non-anthocyanic flavonoids and an increase in the content of total polyphenols, free and total anthocyanins. Despite some changes in volatile composition, the results are not sufficient to infer conclusions.

Keywords: wines; ageing; aroma; color; depth

Índice Geral

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
Índice Geral	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
Capítulo 1 Introdução	1
1.1. Objetivo do estudo.....	1
Capítulo 2 Revisão Bibliográfica	2
2.1. O Vinho: breve história da sua origem e produção em Portugal.....	2
2.1.1. Produção, consumo e comércio mundial de vinho.....	5
2.2. Composição química do vinho	7
2.3. Compostos Fenólicos	8
2.3.1. Compostos Flavonóides	8
2.3.1.1. Antocianinas	9
2.3.1.2. Flavanóis	10
2.3.1.3. Flavonóis	12
2.3.2. Compostos não Flavonóides	12
2.3.2.1. Ácidos Fenólicos	12
2.3.2.2. Estilbenos	13
2.4. Compostos Voláteis.....	14
2.4.1. Terpenos.....	15
2.4.2. Norisoprenóides.....	16
2.4.3. Álcoois superiores	16
2.4.4. Ésteres	17
2.4.5. Ácidos carboxílicos	18
2.4.6. Aldeídos e Cetonas.....	18
2.4.7. Fenóis Voláteis	18
2.4.8. Lactonas	19
2.5. Processo de Vinificação.....	20
2.6. Envelhecimento de Vinhos.....	22
2.6.1. Em barricas e garrafas.....	22
2.6.2. Métodos alternativos	24

2.6.3. Em profundidade.....	24
2.7. Determinação da Cor do Vinho – Métodos convencionais.....	27
2.8. Análise dos Compostos Voláteis	28
2.8.1. Microextração em fase sólida (SPME).....	29
2.8.2. Extração Líquido-Líquido (LLE)	31
Capítulo 3 Materiais e Métodos	32
3.1. Determinação dos parâmetros físico-químicos	32
3.1.1. Determinação do Teor Alcoólico – Método de Ebulliometria	33
3.1.2. Determinação da Acidez Volátil – Método Oficial: Cazenave	33
3.1.3. Determinação da Acidez Total – Titulação potenciométrica	33
3.1.4. Determinação do Dióxido de Enxofre Livre e Total – Titulação iodométrica	33
3.1.5. Determinação do pH	33
3.2. Composição fenólica e cor – Espectrofotometria UV-VIS.....	34
3.2.1. Intensidade e Tonalidade da Cor.....	34
3.2.2. Índice de Polifenóis Totais – Índice de Folin-Ciocalteu (IF).....	34
3.2.3. Determinação das Antocianinas Livres (AL)	35
3.2.4. Determinação Flavonóides Totais (FT), Flavonóides não Antociânicos (FnA) e Antocianinas Totais (AT).....	35
3.3. Análise dos Compostos Voláteis	37
3.3.1. Extração em HS-SPME	37
3.3.2. Extração Líquido-Líquido	37
3.3.3. Análise Cromatográfica	37
3.3.4. Identificação e quantificação dos compostos	38
3.4. Análise Estatística.....	39
Capítulo 4 Resultados e Discussão	40
4.1. Análises Físico-químicas	40
4.2. Características Cromáticas	41
4.3. Análise dos Compostos Voláteis	44
4.4. Análise Canónica Discriminante	53
Capítulo 5 Conclusões	54
5.1. Considerações Finais	54
5.2. Perspetivas Futuras	55
Bibliografia.....	56
Anexos	63

Índice de Figuras

Figura 1 -História do vinho na Península Ibérica (Retirado de Infovini, 2021)	2
Figura 2 -Ânfora de vinho romana datada de cerca de 100 a.C., encontrada por Jacques-Yves Cousteau e Fernand Benoit no Naufrágio do Grand Congloué, na costa da França no início dos anos 1950 (Retirado de M. Plotkin, 2021)	3
Figura 3 -Principais países com maior área vinícola, referente aos anos de 2010 a 2020 (Adaptado de OIV, 2021).....	5
Figura 4 -Principais países produtores de vinho em 2020 (Adaptado de OIV, 2021).....	5
Figura 5 -Consumo de vinho no ano de 2020 (Adaptado de OIV, 2021).....	6
Figura 6 -Composição química do vinho e quantidades médias dos principais compostos do vinho (Adaptado de Sumbly <i>et al.</i> , 2010)	7
Figura 7 -Estrutura química dos flavonóides (Retirado de Teixeira <i>et al.</i> , 2013).....	8
Figura 8 -Estrutura das antocianinas encontradas em <i>Vitis vinifera</i> (Adaptado de Kennedy., 2008)	9
Figura 9 -Estruturas químicas dos principais flavano-3-ol (Retirado de Cabrita <i>et al.</i> , 2003).....	10
Figura 10 -Procianidinas presentes na uva e no vinho (Adaptado de Garrido & Borges., 2013).....	11
Figura 11 -Estruturas químicas dos principais flavonóis (Adaptado de Garrido & Borges., 2013)...	12
Figura 12 -Classificação do aroma do vinho de acordo com a sua origem ao longo da produção de vinho (Adaptado de Oliveira., 2000)	14
Figura 13 -Principais monoterpenos encontrados no vinho (Retirado de Ruiz <i>et al.</i> , 2019)	15
Figura 14 -Degradação do β -caroteno conduzindo a formação de norisoprenóides em C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ e C ₁₃ (Retirado de Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006b)	16
Figura 15 -Formação de acetato de etilo (Adaptado de Jackson, 2008)	17
Figura 16 -Diagrama de produção de vinho (Adaptado de Jackson, 2008)	20
Figura 17 -Submersão de garrafas de vinho no fundo do mar pela empresa <i>Crusoe Treasure</i> (Retirado de: Kassam, 2021)	24
Figura 18 -Penetração da luz em oceano aberto e em zonas costeiras (Adaptado de Prazeres e Renema, 2018)	25
Figura 19 -Evolução da cor em vinhos tintos (Adaptado de Marin, 2013)	27
Figura 20 -Amostras de vinho analisadas	32
Figura 21 -Gráfico ilustrativo para determinar a concentração de Flavonóides Totais, Flavonóides não Antociânicos e Antocianinas Totais	35
Figura 22 -Equipamento usado no estudo dos compostos voláteis	38
Figura 23 -Cromatogramas obtidos através de HS-SPME-GC/TOFMS. (A) - vinho envelhecido em cave (VT); (B) - vinho envelhecido em profundidade (VP1) e (C) - vinho envelhecido em profundidade (VP2)	45

Figura 24 -Cromatogramas obtidos através de LLE-GC/TOFMS.(A) - vinho envelhecido em cave (VT); (B) - vinho envelhecido em profundidade (VP1) e (C) - vinho envelhecido em profundidade (VP2)	45
Figura 25 –Principais classes de compostos identificados nos vinhos e respectivas técnicas de extração	52
Figura 26 –Análise Canónica Discriminante	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 -Características dos vinhos analisados no estudo	32
Tabela 2 -Análise sumária dos vinhos envelhecidos em cave, profundidade 1 e 2 (VT, VP1 e VP2), respetivamente	40
Tabela 3 -Valores das médias \pm desvio padrão dos parâmetros IC, TC, IF, AL, FT, FnA e AT para VT, VP1 e VP2	41
Tabela 4 -Ésteres identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	46
Tabela 5 -Ésteres identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.....	47
Tabela 6 -Álcoois identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	48
Tabela 7 -Álcoois identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	49
Tabela 8 -Ácidos carboxílicos identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	49
Tabela 9 -Ácidos carboxílicos identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	50
Tabela 10 -Compostos voláteis identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	50
Tabela 11 -Compostos voláteis identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2	51

Abreviaturas

- Genéricas

Abs – Absorvância

AL – Antocianinas Livres

AT – Antocianinas Totais

a.C. - antes de Cristo

CAR/DVB/PDMS-Carboxen/divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (do inglês, *carboxen / divinylbenzene / polydimethyl siloxane*)

d.C. – depois de Cristo

FA – fermentação alcoólica

FnA – Flavonóides Não Antociânicos

FT – Flavonóides Totais

HS-SPME-Microextração em Fase Sólida no Espaço de Cabeça (do inglês, *headspace solid phase micro extraction*)

HS-SPME-GC/TOFMS - Micro-extração em fase sólida no espaço de cabeça acoplada a cromatografia gasosa com detecção de espectrometria de massa de tempo de voo

IC – Intensidade da Cor

IF – Índice de Folin-Ciocalteu

LLE- Extração Líquido-Líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*)

NaCl - cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

SO₂ – Dióxido de Enxofre

SPME – Microextração em Fase Sólida

TC – Tonalidade da Cor

TDN - 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno

UV-Vis – Ultra-violeta/visível

- Entidades

IVV - Instituto da Vinha e do Vinho

NIST – National Institute of Standards and Technology

OIV – *International Organisation of Vine and Wine*

- Unidades de Medida

°C – Graus Celcius

g – Grama

ha – Hectares

ng - Nanogramas

l - Litro

kha - Milhares de hectares

mha – Milhões de hectares

mhl – Milhões de hectolitros

min – Minuto

mg – Milígrama

ml – Mililitro

rpm – Rotações por minuto

ua - Unidades de absorvância

µL – Microlitro

Capítulo 1 | Introdução

O envelhecimento de vinhos é uma prática corrente em enologia, que nos últimos anos tem sofrido inovações, exemplo disso é a submersão de vinho engarrafado no mar ou albufeiras por períodos variáveis. Esta inovação pode ser considerada uma excentricidade, modismo, ou simplesmente uma estratégia de *marketing* para aumentar o consumo e o enoturismo, mas a realidade é que se tem verificado não só em Portugal, mas noutros países um crescimento desta prática para envelhecer os vinhos e os resultados obtidos têm sido otimistas para o setor.

Provas realizadas em vinhos encontrados décadas ou mesmo séculos após naufrágios apresentam características sensoriais aceitáveis e são valorizados no mercado. Enólogos e produtores constataam que o vinho envelhecido em profundidade, comparado com o mesmo vinho que estagia em cave, é ligeiramente diferente. O vinho submerso envelhece mais rapidamente e a nível organolético observa-se maior complexidade no nariz, aumento de equilíbrio e frescura na boca, presença de taninos, aromas minerais, florais e frutados muito intensos. Em provas hedónicas, o vinho submerso é o mais apreciado.

No fundo do mar, consegue-se uma temperatura mais baixa e sem grande oscilação, baixa luminosidade ou praticamente inexistente, a pressão existente e a agitação das marés originam vinhos que são um verdadeiro “tesouro aquático”. Vários autores abordam esta prática (Palacios *et al.*, 2014; Mercer, 2021; Pomranz, 2021; Kassam, 2021), mas até ao momento nenhum trabalho científico foi publicado acerca desta temática.

1.1. Objetivo do estudo

O principal objetivo deste estudo é avaliar o impacto do envelhecimento nas características físico-químicas de vinhos, em particular verificar alterações na composição volátil e ao nível da cor em vinhos engarrafados e posteriormente mergulhados em profundidade no mar.

Capítulo 2 | Revisão Bibliográfica

2.1. O Vinho: breve história da sua origem e produção em Portugal

Desde os tempos mais remotos, o vinho desempenha um papel de relevo em quase todas as civilizações. Repleto de simbologia, impregnado de religiosidade e de misticismo, o vinho surge desde muito cedo na nossa literatura, tornando-se numa fonte de lendas e inspiração de mitos. Algumas expressões atribuídas a este saboroso produto, como: "Dádiva de Deuses", "Sangue de Cristo" e "Essência da própria vida", corroboram bem o papel do vinho na vertente cultural, religiosa e denotam a sua importância na nossa civilização (IVV,2021).

O vinho não é apenas a bebida mais antiga do mundo, este foi utilizado como analgésico, antisséptico, solvente, sedativo, moeda de troca no comércio, purificador de água e até como fonte de inspiração (Plotkin, 2021). Não se sabe ao certo quando e onde foi produzido pela primeira vez, mas existem registos arqueológicos na China em 7 000 anos a.C., da produção de bebidas fermentadas obtidas a partir de arroz, mel e frutas (Jackson, 2008).

Evidências arqueológicas apontam para a Transcaucásia, região que coincide com os atuais países da Armênia, do Azerbaijão e da Geórgia e partes do Irão e Turquia, o lugar onde o ser humano começou a plantar uvas de forma sistemática e a transformá-las em vinho (Plotkin, 2021). Existem dados da existência de vinho com mais de 7 500 anos, sendo os primeiros registos advêm do início do quinto milénio a.C., nas montanhas de Zargos no norte do Irão (Jackson, 2008).

Na Península Ibérica a vinha terá sido cultivada pela primeira vez, há cerca de 2 000 anos a.C., pelos *Tartessos*, no vale do Tejo e Sado (Figura 1) (IVV,2021).



Figura 1 - História do vinho na Península Ibérica (Retirado de Infovini, 2021).

Mais tarde, por volta do século X a.C., os *Fenícios* apoderam-se do comércio dos *Tartessos*, e introduziram na Lusitânia algumas castas de videiras. No século VII a.C., os *Gregos*

instalam-se na Península Ibérica e desenvolveram a viticultura, dando especial atenção à arte de fazer vinho. Os *Celtas* chegaram à Península Ibérica, no século VI a.C., e trouxeram consigo as variedades de videira que já cultivavam, bem como algumas técnicas de tanoaria. Após a conquista da Península Ibérica pelos *Romanos*, a cultura da vinha sofreu uma modernização, devido à introdução de novas variedades de uvas e melhoramento das técnicas de cultivo, nomeadamente a poda (IVV,2021).

Na época dos *Gregos* e *Romanos*, eram utilizados jarros e ânforas de barro (Figura 2) para fazer o transporte da zona de produção para os locais de consumo, esses recipientes eram frágeis, pesados e difíceis de manusear. Para tornar o transporte mais acessível foram concebidas barricas de madeira (Martínez-Gil *et al.*, 2018; Carpena *et al.*, 2020b).



Figura 2 - Ânfora de vinho romana datada de cerca de 100 a.C., encontrada por Jacques-Yves Cousteau e Fernand Benoit no Naufrágio do Grand Congloué, na costa da França no início dos anos 1950 (Retirado de M. Plotkin, 2021).

É durante os séculos VI e VII d.C., que se dá a grande expansão do Cristianismo e o vinho torna-se indispensável no ato sagrado da comunhão. Apesar da religião muçulmana proibir o consumo de bebidas fermentadas, onde se incluía o vinho, a cultura da vinha e a produção de vinho não foram totalmente proibidos, visto que para os Árabes a agricultura era muito importante e o vinho continuava a servir de moeda de troca. Nos séculos XI e XII, com o domínio dos Almorávidas e Almoadas, os preceitos do Corão foram levados com maior rigor, dando-se um retrocesso na cultura da vinha. A fundação de Portugal, em 1143 por D. Afonso Henriques e a conquista da totalidade do território português aos mouros em 1249, permitiu a instalação de diversas ordens religiosas, militares e monásticas responsáveis pelo alargamento de áreas de cultivo agrícola, nomeadamente a vinha (IVV,2021).

Nos séculos XV e XVI, no período correspondente à expansão portuguesa, o transporte do vinho era feito através das naus e galeões, que partiam para a Índia. Após os Descobrimentos, os

vinhos portugueses começam a ser transportados e comercializados para todo o mundo, armazenados em barricas. As viagens eram na sua maioria longas (cerca de 6 meses), os vinhos permaneciam nas barricas, espalhadas pelos porões das galés, agitadas pelo balancear das ondas, expostas ao sol e por vezes submersas na água no fundo dos navios. Graças a essas viagens, observou-se que o vinho envelhecia de forma suave, proporcionado pelo calor dos porões e pela permanência dos vinhos nos tonéis, tornando-os ímpares, preciosos e bastante apreciados. O vinho que não era vendido retornava aos produtores e por sofrer, alterações vantajosas na sua qualidade durante a viagem, era vendido a preços mais elevados. Este vinho ficou conhecido em todo o mundo, pelo vinho de “Roda” ou de “Torna viagem”, surgindo um conhecimento empírico de um certo tipo de envelhecimento seria benéfico para o vinho, o que se veio a comprovar mais tarde, com as técnicas científicas (IVV,2021).

Mais tarde no século XVIII, a vitivinicultura, tal como outros aspetos da vida nacional sofreram influência da forte personalidade do Marquês de Pombal. O século XIX foi um período negro para a vitivinicultura, quer a nível nacional quer europeu, devido à praga da filoxera (IVV,2021).

Desde então, Portugal sofreu várias alterações ao nível da regulamentação oficial de várias denominações de origem portuguesas, surgiram organismos reguladores, e com a adesão de Portugal à Comunidade Europeia foram introduzidas novas regulamentações que possuem um papel importante na preservação da qualidade e do prestígio dos vinhos portugueses (Cardeira., 2009).

Segundo o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV,2021), atualmente estão reconhecidas e protegidas em Portugal, 39 Denominações de Origem e 14 Indicações Geográficas.

2.1.1. Produção, consumo e comércio mundial de vinho

A cultura da vinha está fortemente enraizada em Portugal, fazendo parte integrante da paisagem natural, da história e da cultura dos portugueses. Portugal possui 194,0 kha de vinha plantada, sendo a área mundial de vinhas plantadas (produção de vinho, uvas de mesa e passas) de aproximadamente 7,3 mha em 2020. Os países com maior área vinícola são: Espanha, França, China, Itália, Turquia e Estados Unidos. Portugal surge em 9º lugar (Figura 3) (OIV, 2021).

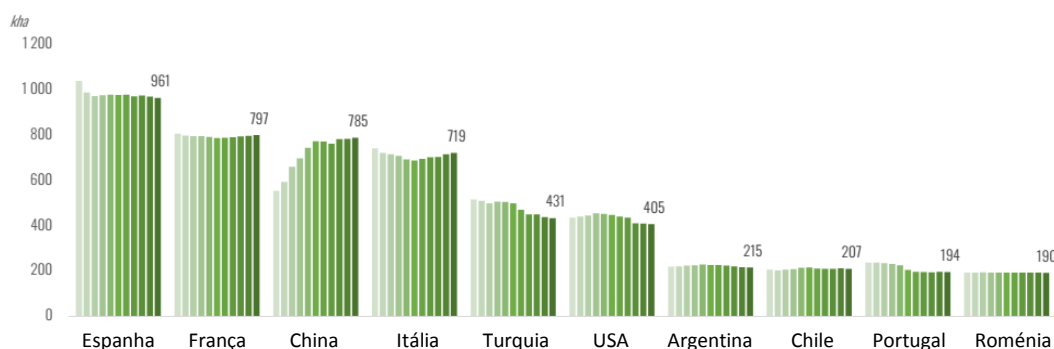


Figura 3 - Principais países com maior área vinícola, referente aos anos de 2010 a 2020 (Adaptado de OIV, 2021).

Segundo a OIV, a produção vitivinícola mundial (excluindo sumos e mostos) em 2020, situa-se entre 253,9 e 262,2 mhl, com uma estimativa de 260,0 mhl, representado um aumento de 2,5 mhl face ao ano de 2019. Portugal produziu cerca de 6,4 mhl de vinho (Figura 4) permanecendo em linha com a sua produção de 2019 e a sua média dos últimos 5 anos (OIV, 2021). Ocupando o décimo primeiro lugar como produtor mundial de vinho, o que demonstra a importância deste produto para um país de reduzidas dimensões.

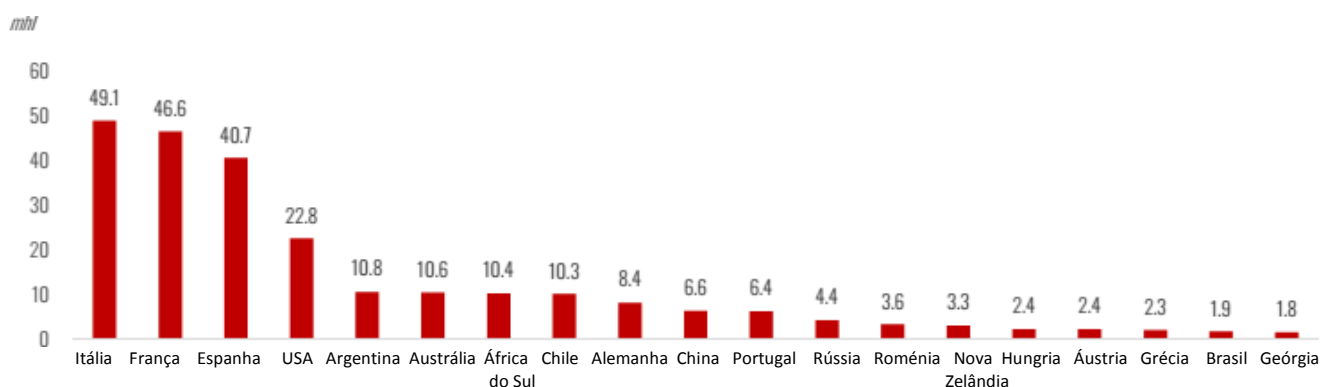


Figura 4 - Principais países produtores de vinho em 2020 (Adaptado de OIV, 2021).

O consumo mundial de vinho em 2020 é estimado em 234,0 mhl, verificando-se uma redução significativa de 3% face ao ano de 2019. Como ilustrado na Figura 5, os maiores consumidores de vinho *per capita* do mundo são os Portugueses, com 51,9 litros por ano, seguidos dos cidadãos Italianos, com 46,6 litros e em terceiro lugar os Franceses com 46,0 litros (OIV, 2021). Aliado a um *terroir* único, o vinho português tem conseguido afirmar-se a nível internacional, como um produto único, diferenciador, apresentando uma excelente qualidade-preço.

Segundo Cardeira (2009), são vários os fatores que afetam o consumo de vinho, nomeadamente a entrada de novos produtos substitutos, como a cerveja, refrigerantes, água engarrafada e a alteração profunda das condições de vida. Mais recentemente, todas as campanhas de consciencialização para o consumo racional de bebidas alcoólicas e o seu efeito na condução, aliada a uma melhor fiscalização dos condutores, contribuíram para esta mudança de hábitos.

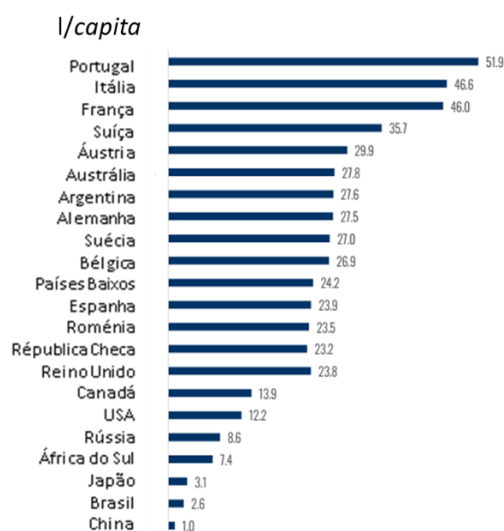


Figura 5 - Consumo de vinho no ano de 2020 (Adaptado de OIV, 2021).

Em relação ao volume de exportação mundial, em 2020 verificou-se uma ligeira diminuição (-1,7%) em relação a 2019, ainda assim as exportações com 105,8 mhl está em linha com os valores dos últimos cinco anos. Portugal exportou 3,1 mhl em 2020, um crescimento de 5% face ao ano de 2019 (OIV, 2021).

2.2. Composição química do vinho

O vinho é o produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica (FA), total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas, caracterizado por ter um título alcoométrico adquirido igual ou superior a 8,5% vol. ou 9% vol., consoante as especificações da região vitivinícola, e um título alcoométrico total não superior a 15% vol. (Regulamento (CE) n.º 479/2008 de 29 de abril).

Segundo Petretto *et al.*, (2021), a sua composição é bastante variável e depende de vários fatores, como a variedade da uva, as condições edafo-climáticas, o transporte da matéria-prima, as técnicas de vinificação e interações entre compostos. Este é maioritariamente constituído por água (85 a 90%), etanol (cerca de 12%), glicerol, ácidos (0,5%), compostos voláteis (0,5%), vitaminas, minerais, compostos azotados e compostos fenólicos (Figura 6) (Sumbly *et al.*, 2010; Petretto *et al.*, 2021).

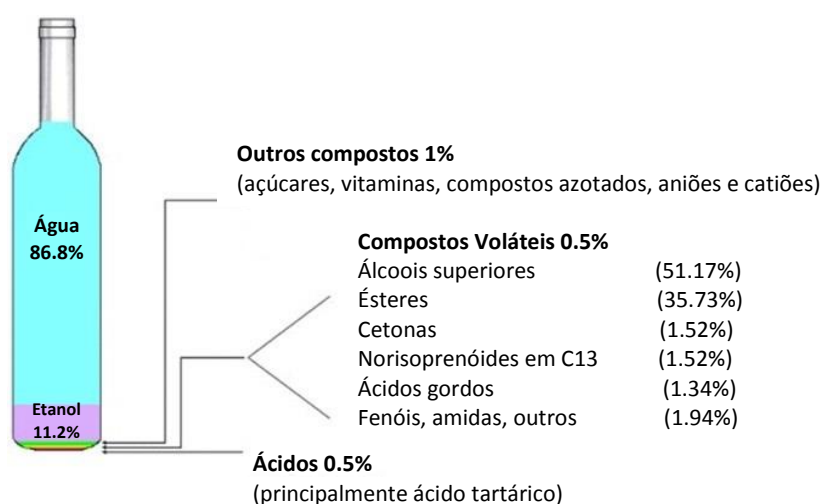


Figura 6 - Composição química do vinho e quantidades médias dos principais compostos do vinho (Adaptado de Sumbly *et al.*, 2010).

O vinho é uma mistura complexa de várias centenas de compostos, muitos destes encontram-se em concentrações muito baixas, no entanto são responsáveis pela cor, aroma e sabor contribuindo para a sua evolução e qualidade (Sumbly *et al.*, 2010).

Para Gambetta *et al.* (2014), o conceito de qualidade é um conceito muito subjetivo, que entre outros fatores, determina o preço que uma garrafa de vinho pode alcançar no mercado. Os atributos sensoriais do vinho são definidos pela sua composição física e química, principalmente compostos fenólicos e voláteis, que desempenham um papel importante na qualidade do vinho (Pérez-Navarro *et al.*, 2020).

2.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante nas características sensoriais das uvas e do vinho, são responsáveis por algumas das propriedades organolépticas, nomeadamente a cor, o sabor, o amargor e a adstringência (Garrido & Borges., 2013; Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021). São responsáveis pelas diferenças entre uvas e/ou vinhos tintos e brancos, devido à presença ou ausência de antocianinas (Cabrita *et al.*, 2003), apresentando-se em concentrações superiores nos vinhos tintos (Garrido & Borges., 2013; Pérez-Navarro *et al.*, 2020).

Estes compostos apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo caracterizados por apresentar um anel de benzeno, em que pelo menos um dos hidrogénios é substituído por um grupo hidroxilo (-OH) (Jackson, 2008). Podem ser classificados em compostos flavonóides e não flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte as antocianinas, flavanóis e flavonóis, e no segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos) e estilbenos.

De acordo com Garrido & Borges (2013), o teor e o tipo de compostos fenólicos no vinho variam devido a vários fatores, como a variedade, o estado de maturação e sanitário da uva, o clima, o solo, a tecnologia de vinificação, bem como as condições de fermentação e envelhecimento.

2.3.1. Compostos Flavonóides

Estes compostos caracterizam-se por apresentarem uma estrutura com 15 átomos de carbono, C₆-C₃-C₆ nos quais dois anéis benzénicos, A e B, são ligados por um heterocíclico, C conforme ilustrado na Figura 7. De acordo com o estado de oxidação do anel C, esses compostos são divididos em diversas classes (Garrido & Borges., 2013; Teixeira *et al.*, 2013).

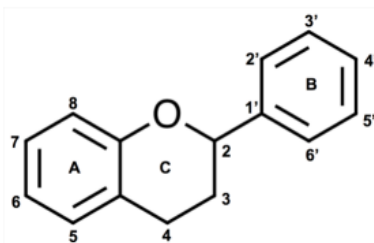


Figura 7 - Estrutura química dos flavonóides (Retirado de Teixeira *et al.*, 2013).

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a esta família de compostos que se encontram nas grainhas, na polpa e na película das uvas. Estes compostos podem encontrar-se no

estado livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares, não flavonóides, ou ainda combinações dos anteriores (Cabrita *et al.*, 2003).

2.3.1.1. Antocianinas

As antocianinas são os compostos mais importantes no que se refere à cor das uvas e vinhos tintos, localizam-se na película e também na polpa de algumas castas tintureiras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Estruturalmente são glucósidos de polihidroxi ou polimetoxi dos sais de flavilium (2-fenil-benzopirilo). Estas diferem pelo número de grupos hidroxilo e metilo presentes no anel lateral, pela natureza, número de açúcares ligados à molécula e pela ausência de cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (Cabrita *et al.*, 2003).

As formas agliconas das antocianinas denominam-se antocianidinas, estas são instáveis em água e muito menos solúveis que as antocianinas, por isso se pensa que a glicosilação proporcione estabilidade e solubilidade a estes pigmentos (Cabrita *et al.*, 2003). As antocianinas correspondentes aos monoglucósidos das antocianidinas, comumente encontradas nas uvas e vinho são a cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 8) (Garrido & Borges., 2013; Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021).

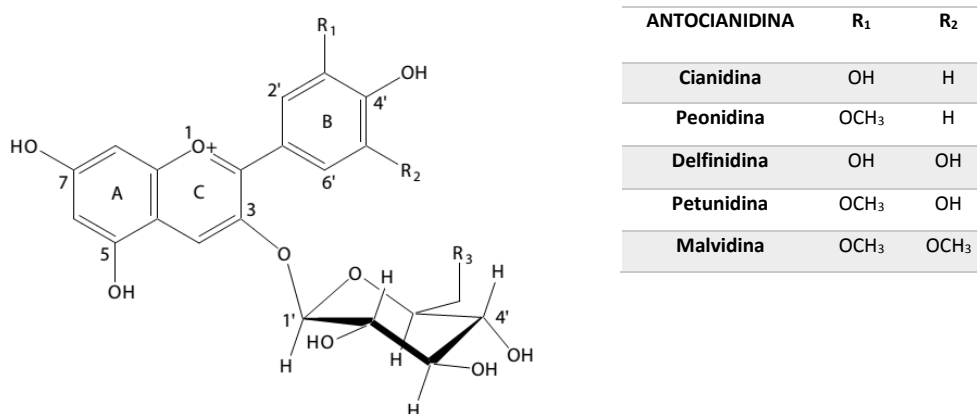


Figura 8 - Estrutura das antocianinas encontradas em *Vitis vinifera* (Adaptado de Kennedy., 2008).

As suas quantidades relativas variam com a casta, mas a malvidina é sempre maioritária (Cabrita *et al.*, 2003) e mais estável (Jackson, 2008). Os principais ácidos que podem esterificar a glucose na posição 3, são o cafeico, o *p*-cumárico e o acético (Kennedy., 2008). Quando as antocianinas interagem com outros compostos fenólicos do vinho, ocorre um fenómeno conhecido como co-pigmentação, que geralmente estabiliza as antocianinas e, portanto, a cor (Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021).

Durante o envelhecimento do vinho, as antocianinas participam em várias reações (redução, oxidação e polimerização) envolvendo outras moléculas do vinho, levando à formação de compostos mais estáveis (De Freitas *et al.*, 2017). A degradação das antocianinas pode ocorrer pela ação da luz ou pelo efeito de oxidação, em que ocorre a formação de chalconas e posteriormente darão lugar à rutura do heterociclo C. Este fenómeno é bastante favorável a temperaturas elevadas, o que provoca uma perda de cor irreversível no vinho. Por esta razão deve-se conservar os vinhos a temperaturas moderadas, protegidos da luz e de oxigénio (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.3.1.2. Flavanóis

Os flavanóis mais importantes são os flavano-3-ol e as proantocianidinas ou taninos condensados. Os flavano-3-ol caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado, são encontrados nas uvas e nos vinhos a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, que são epímeros no carbono 3. Nas uvas encontra-se ainda, no estado livre pequenas quantidades de galato de epicatequina (Figura 9) (Cabrita *et al.*, 2003).

As catequinas encontram-se fundamentalmente nas grainhas, películas e relativamente pouco na polpa, são responsáveis pelo sabor amargo dos vinhos (Teixeira *et al.*, 2013).

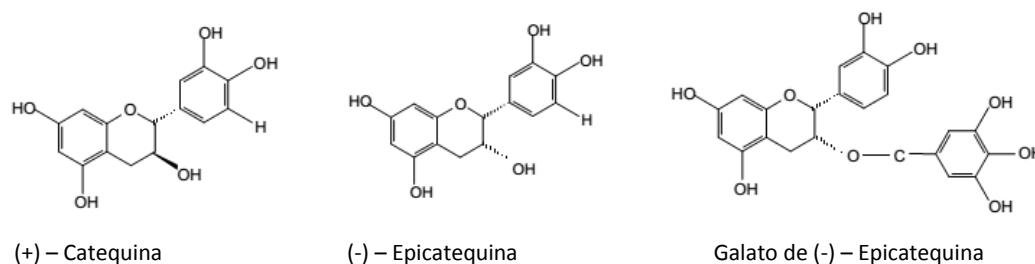


Figura 9 - Estruturas químicas dos principais flavano-3-ol (Retirado de Cabrita *et al.*, 2003).

Os taninos são compostos fenólicos que possuem a capacidade de se combinarem com proteínas e outros polímeros como os polissacáridos, provocando a sensação de adstringência, que não é mais que a perda do efeito de lubrificação da saliva por precipitação das proteínas (Cabrita *et al.*, 2003). Além da adstringência, os taninos também podem possuir amargor, sensação provocada pelos taninos de menor peso molecular (Kennedy *et al.*, 2008).

Os taninos condensados ou proantocianidinas, são compostos que aquecidos em meio fortemente ácido e alcoólico originam as antocianidinas. A unidade fundamental das proantocianidinas são moléculas de flavano-3-ol, e consoante o número de vezes que esta unidade se repete podem ser dímeros, trímeros, oligoméros ou polímeros (Cabrita *et al.*, 2003).

As proantocianidinas das uvas e dos vinhos são sobretudo procianidinas, ou seja, oligômeros e polímeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina unidas por ligações C₄-C₈ e C₄-C₆ (Figura 10) (Cabrita *et al.*, 2003; Garrido & Borges., 2013).

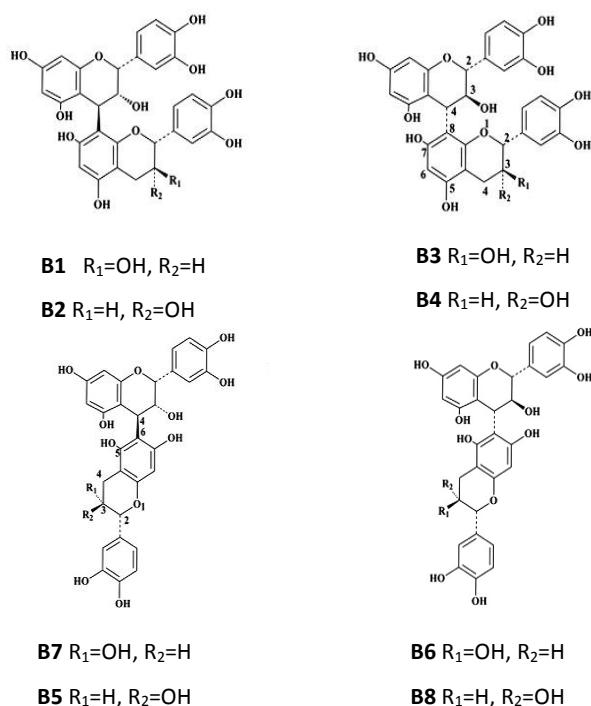


Figura 10 - Procianidinas presentes na uva e no vinho (Adaptado de Garrido & Borges., 2013).

Consoante se liberte cianidina (polímeros de catequina e epicatequina) ou delphinidina (constituídas por galocatequinas e epigalocatequinas), estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas (Cabrita *et al.*, 2003).

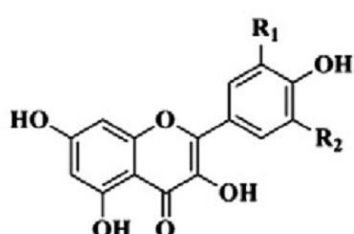
As proantocianidinas desempenham um papel importante no processo de envelhecimento do vinho devido às suas capacidades de oxidação, condensação e polimerização (Garrido & Borges., 2013).

Os taninos hidrolisáveis resultam da ligação de um açúcar geralmente a glucose e um composto fenólico, principalmente o ácido gálico (galotaninos) ou ao ácido elágico (elagitaninos) (Cabrita *et al.*, 2003; Garrido & Borges., 2013), estes não aparecem naturalmente nas uvas *Vitis vinifera*, apenas em uvas do subgênero *Muscadine* e em vinhos envelhecidos em barricas sendo propostos na literatura como marcadores de envelhecimento (Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021).

2.3.1.3. Flavonóis

Os flavonóis são caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3, possuem cor amarela e nas uvas encontram-se apenas nas películas, como glucósidos facilmente hidrolisáveis e nos vinhos tintos encontram-se as agliconas no estado livre (Cabrita *et al.*, 2003).

Embora sejam uma família minoritária nas uvas, podem ter um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de co-pigmentação com as antocianinas (Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021). Nos vinhos os flavonóis mais importantes são o quempferol, a quercetina e a miricetina (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b) (Figura 11).



FLAVONÓIS	R ₁	R ₂
Quempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH

Figura 11 - Estruturas químicas dos principais flavonóis (Adaptado de Garrido & Borges., 2013).

Segundo Teixeira *et al.*, (2013), os flavonóis podem atuar como protetores de raios ultravioleta e temperaturas extremas, bem como eliminadores de radicais livres, permitindo que os vinhos envelhecidos mantenham a coloração vermelha e reflexos violetas, característicos dos vinhos tintos mais jovens.

2.3.2. Compostos não Flavonóides

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzenos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos, as concentrações são da ordem de 100 a 200 mg/L no vinho tinto e 10 a 20mg/L no vinho branco (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.3.2.1. Ácidos Fenólicos

Dos ácidos derivados do ácido benzóico, os mais importantes são os ácidos vanílico, siríngico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster dos flavanóis. Outros ácidos benzóicos existentes em menor quantidade são o protocatéquico, o gentísico e o *p*-hidroxibenzóico. Estes ácidos encontram-se

nas uvas na forma de ésteres e no decurso da elaboração e conservação do vinho vão sofrendo hidrólise, podendo encontrar-se no vinho na forma livre ou combinada (Cabrita *et al.*, 2003).

Os ácidos cinâmicos encontram-se na uva combinados com o ácido tartárico na forma de monoésteres. Os ácidos mais importantes que derivam do ácido cinâmico são o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico. Esses ácidos estão associados ao processo de acastanhamento do vinho branco e são precursores de fenóis voláteis (Garrido & Borges., 2013).

2.3.2.2. Estilbenos

Os estilbenos possuem uma estrutura composta por dois anéis benzénicos unidos por uma cadeia de etano ou etileno. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) é o composto principal desta classe. Este composto está presente nas uvas e no vinho e é considerado por alguns autores como uma fitoalexina, ou seja, uma toxina produzida devido a infeção fúngica (por exemplo, por *Botrytis cinérea* ou *Plasmopora viticola*) ou a partir de stress abiótico (Garrido & Borges., 2013).

2.4. Compostos Voláteis

O aroma traduz a sensação recebida pelo cérebro quando o epitélio olfativo é atingido por moléculas volatizadas do vinho, por via nasal direta, ou em contacto com a boca, via retronasal (Pittari e Piombino, 2021), este é um dos parâmetros mais importantes na determinação da qualidade de um vinho e contribui para a aceitação ou rejeição por parte do consumidor (Marín-San Román *et al.*, 2021).

Segundo Oliveira (2000), de entre os vários compostos que constituem o vinho, apenas os compostos voláteis são capazes de estimular os órgãos sensoriais responsáveis pelo olfato. Trata-se de moléculas de pequeno tamanho, de hidrofobicidade média e peso molecular geralmente entre os 30 g/mol e 300 g/mol.

Foram identificados no vinho, mais de 800 compostos voláteis, as suas concentrações variam entre os mg/L e os ng/L, muitos encontram-se abaixo do limiar de percepção sensorial humana (Carpena *et al.*, 2020a; Marín-San Román *et al.*, 2020; Pittari e Piombino, 2021). De acordo com diferentes autores (Oliveira., 2000; Carpena *et al.*, 2020a; Piras *et al.*, 2020), o aroma do vinho pode ser classificado em três categorias, como ilustrado na Figura 12:

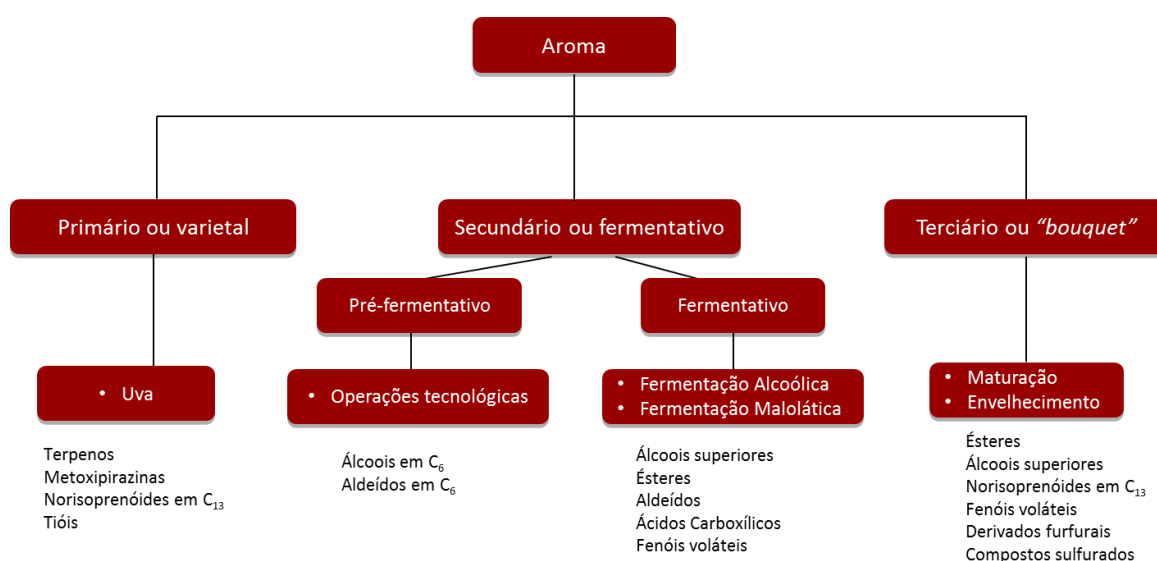


Figura 12 - Classificação do aroma do vinho de acordo com a sua origem ao longo da produção de vinho (Adaptado de Oliveira., 2000).

- **Aroma Primário ou varietal**, característico da variedade de uva de onde provém, depende essencialmente do tipo de solo, das condições climáticas, do estado sanitário e do grau de maturação da uva. A maioria das castas é pouco aromática, possuindo essencialmente precursores de aromas. Os precursores são sobretudo substâncias não voláteis como glicosídeos, ácidos fenólicos, ácidos gordos e conjugados de cisteína capazes de originar compostos

aromáticos pela ação de enzimas específicas. Os compostos relacionados à tipicidade aromática das castas, são na sua maioria terpenos, metoxipirazinas, norisoprenóides em C₁₃ e tióis;

- **Aroma Secundário ou fermentativo**, pode ser dividido em pré-fermentativo ou fermentativo. O primeiro é revelado durante a colheita e das operações subsequentes, nomeadamente transporte, desengace, prensagem, maceração e clarificação. Estes aromas advêm essencialmente de álcoois e aldeídos em C₆, formados a partir de certos lípidos por ação de enzimas da uva. O aroma fermentativo, é provocado pelas leveduras durante a FA e depende de vários fatores, nomeadamente da temperatura e da estirpe de levedura utilizada. Podem ser também originados compostos deste grupo pelas bactérias lácticas no caso de ocorrer fermentação maloláctica. Os compostos implicados neste aroma são os álcoois superiores, ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos e fenóis voláteis;

- **Aroma Terciário ou "bouquet"**, resulta de transformações ocorridas durante a maturação e envelhecimento do vinho caracterizadas por um conjunto de reações físico-químicas de oxidação e de redução dos compostos existentes no vinho jovem. Os compostos voláteis que sofrem modificações são os ésteres, álcoois superiores, norisoprenóides em C₁₃, fenóis voláteis, derivados furfurais e compostos sulfurados.

2.4.1. Terpenos

Os terpenos são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, foram identificados cerca de 70 terpenos em uvas *Vitis vinifera* e vinhos, diferenciados pelo número de carbono que apresentam, são agrupados em monoterpenos (10 átomos de carbono) e sesquiterpenos (15 átomos de carbono) (Pereira *et al.*, 2020).

No entanto, os terpenos que apresentam mais interesse do ponto de vista olfativo são os álcoois monoterpénicos como o linalol, o geraniol, o nerol, o citranelol, o ho-trienol e o α -terpineol, (Figura 13), que contribuem para o aroma varietal devido aos seus aromas florais, frutados e cítricos (Ruiz *et al.*, 2019).

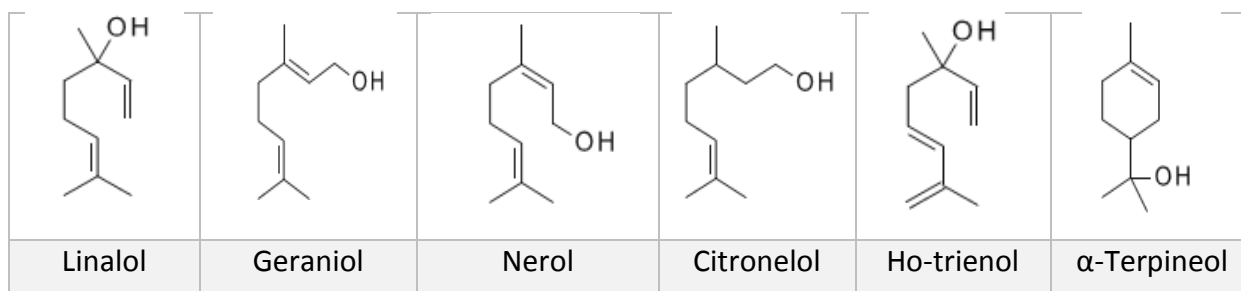


Figura 13 - Principais monoterpenos encontrados no vinho (Retirado de Ruiz *et al.*, 2019).

2.4.2. Norisoprenóides

Os carotenoides, terpenos com 40 átomos de carbono, são compostos instáveis que ao sofrerem reações químicas e enzimáticas originam entre outros derivados com 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono (Figura 14). Entre eles, norisoprenóides em C₁₃, que apresentam propriedades olfativas interessantes (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Os principais norisoprenóides em C₁₃ nos vinhos são β-damascenona, a β-ionona, o 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) e os isômeros de vistispirano. O primeiro possui um aroma a flores, frutos tropicais e maçã cozida, a β-ionona confere aromas a violeta, amadeirado e framboesa, o TDN apresenta odores a querosene e gasolina e os isômeros de vistispirano, a cânfora e eucalipto (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Mendes-Pinto., 2009).

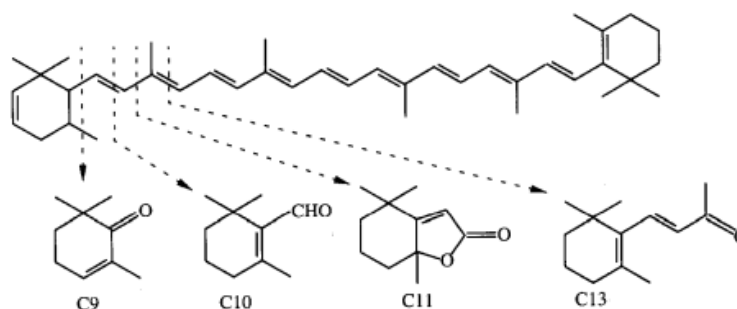


Figura 14 - Degradação do β-caroteno conduzindo a formação de norisoprenóides em C₉, C₁₀, C₁₁ e C₁₃ (Retirado de Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Segundo Ribéreau-Gayon et al., (2006b), normalmente o TDN está ausente nas uvas e vinho jovem, mas pode surgir durante o envelhecimento em garrafa, atingindo concentrações de 200 µg/L, sendo o seu limiar de percepção de 20 µg/L.

2.4.3. Álcoois superiores

Os álcoois superiores são considerados uma família de compostos aromáticos que possuem mais de dois átomos de carbono na estrutura química. A presença destes compostos nas uvas é praticamente insignificante, sendo que a maioria dos álcoois presentes nos vinhos surgem como produtos do metabolismo das leveduras durante a FA, diretamente a partir dos açúcares ou de aminoácidos (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). A sua formação é influenciada por diversos

parâmetros, nomeadamente a temperatura de fermentação, características das leveduras, níveis de azoto assimilável e turbidez (Pereira *et al.*, 2020; Pittari e Piombino., 2021).

Estes compostos são determinantes no aroma dos vinhos, os principais álcoois são o 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, o 2-metil-1-propanol, o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), o 2-feniletanol, 1-propanol, o 1-butanol, o 1-hexanol, o 1-decanol, o 2-butanol e o tirosol. São referidos ainda o 3-metiltio-1-propanol e o triptofol (Oliveira., 2000; Ruiz *et al.*, 2019; Carpena *et al.*, 2020a; Pereira *et al.*, 2020). Por norma, é usual atribuí-lhes cheiro e sabor forte, com exceção do 2-metil-1-butanol, do 2-feniletanol e do 3-metil-1-butanol que conferem aromas de flores, mel e frutas (Oliveira., 2000; Ruiz *et al.*, 2019).

A sua influência no aroma depende das concentrações em que se encontram, presentes em baixas concentrações (inferiores a 300 mg/l) podem contribuir de forma positiva para o aroma, tornam-no mais complexo o *bouquet* do vinho. Em concentrações elevadas (superior a 400 mg/l) tornam-se negativos pela adição de aromas desagradáveis, inibindo a perceção de outros compostos voláteis (Rapp e Mandery, 1986).

2.4.4. Ésteres

Responsáveis pela complexidade aromática dos vinhos, foram identificados mais de 160 compostos (Jackson, 2008; Carpena *et al.*, 2020a). Resultam de uma reação de condensação reversível entre o grupo carboxilo de um ácido orgânico e o grupo hidroxilo de um álcool ou fenol, com a libertação de uma molécula de água (Jackson, 2008; Sumbly *et al.*, 2010). Sintetizados na uva em quantidades vestigiais, a maioria dos ésteres encontrados no vinho são produzidos enzimaticamente durante a FA e durante o envelhecimento, por esterificação química entre um álcool e ácidos a pH baixo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b; Sumbly *et al.*, 2010). Responsáveis pelos aromas “frutados” e “florais”, são principalmente produzidos dois tipos de compostos, acetatos de álcoois superiores e ésteres etílicos de ácidos gordos (Gambetta *et al.*, 2014).

Os acetatos de álcoois superiores como o acetato de etilo, acetato de isobutilo e acetato de isoamilo, possuem descritores a fruta, maçã e banana, respetivamente. O acetato de etilo prevalece nos vinhos, devido à sua rápida formação a partir do etanol e ácido acético (Figura 15).

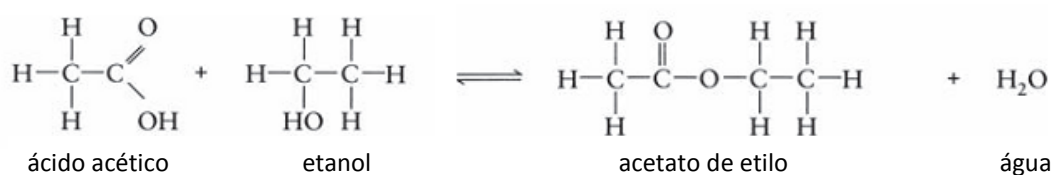


Figura 15 - Formação de acetato de etilo (Adaptado de Jackson, 2008).

O acetato de etilo é um contribuinte importante para o aroma do vinho, em baixas concentrações (≤ 100 mg/l) dando um caráter desejável e frutado ao vinho, no entanto, em concentrações mais altas pode conferir um aroma de solvente/verniz. Os ésteres etílicos dos ácidos gordos, hexanoato de etilo, octanoato de etilo e decanoato de etilo são os mais importantes concedendo aromas frutados aos vinhos (Sumbly *et al.*, 2010; Carpena *et al.*, 2020a).

2.4.5. Ácidos carboxílicos

Neste grupo existe um ácido de extrema importância em enologia, o ácido acético, produzido durante a FA e envelhecimento, caracteriza-se pelo aroma a vinagre e está relacionado com a acidez volátil dos vinhos (Jackson, 2008). Nos vinhos, alguns ácidos podem conferir aromas agradáveis ou desagradáveis, estas diferenças devem-se ao tamanho da cadeia carbonada. Ácidos com pequenas cadeias carbonadas (C_2 a C_5) conferem aromas desagradáveis aos vinhos, o ácido butanoico confere aromas a ranço e a manteiga, o ácido propiônico odor a gordura (Jackson, 2008). Os ácidos com mais de 5 carbonos na cadeia carbonada conferem aromas agradáveis, como é o caso do ácido hexanoico, associado a aromas frutados (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.4.6. Aldeídos e Cetonas

A maioria dos aldeídos encontrados nos vinhos, são produzidos durante a FA ou extraídos da madeira (Jackson, 2008). O aldeído mais abundante nos vinhos é o acetaldeído, resultante da descarboxilação do piruvato, pelo piruvato descarboxilase com libertação de dióxido de carbono. Este composto confere ao vinho um aroma a maçã verde, acima de valores limite é considerado um odor desagradável, associado a vinhos oxidados (Jackson, 2008). A vanilina proveniente da madeira é responsável pelo aroma a baunilha. Outros aldeídos podem ser extraídos da madeira, por exemplo o 2-furfural e 4-metilfurfural, conferindo ao vinho um aroma a manteiga e amadeirado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b; Jackson, 2008).

As cetonas 3-hidroxi-2-butanona e 2,3-butanodiona, são responsáveis pelo aroma a manteiga nos vinhos. Cetonas como a propanona, butanona e pentanona também foram identificados nos vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.4.7. Fenóis Voláteis

Os fenóis voláteis são uma família de voláteis que compreende: fenóis voláteis formados durante o processo de fermentação e glicosídeos derivados da uva; fenóis voláteis formados

durante o processo de fermentação pelo metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos, por leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera*, através da descarboxilação de ferúlico e *p*-cumárico e fenóis voláteis extraídos da madeira, durante o envelhecimento. Enquanto alguns deles contribuem positivamente para a complexidade do aroma do vinho (como o guaiacol e eugenol), outros (4-etilfenol, 4-vinilfenol, 4-etilguaiaicol e 4-vinilguaiaicol) podem estar envolvidos no aparecimento de notas desagradáveis (Pereira *et al.*, 2020; Pittari e Piombino., 2021).

2.4.8. Lactonas

As lactonas são essencialmente formadas por leveduras durante a FA e aumentam durante o envelhecimento do vinho (Pittari e Piombino., 2021). Constituem um subgrupo especial de ésteres formados pela esterificação interna entre os grupos carbonil e hidroxilo, da molécula-mãe, resultando na formação de um éster cíclico (Jackson, 2008). As lactonas mais abundantes são a γ -butirolactona, a 4-carboxi- γ -butirolactona e a 4-etoxi- γ -butirolactona (Oliveira., 2000; Pereira *et al.*, 2020). Estes compostos são responsáveis por aromas agradáveis e frutados, por exemplo a γ -octalactona e a γ -nonalactona possuem descritor de aroma a coco, frutado e amêndoa.

2.5. Processo de Vinificação

O processo de vinificação, como exemplificado na Figura 16, corresponde ao conjunto de operações mecânicas e químicas que transformam a uva ou mosto em vinho. Este processo tem evoluído ao longo dos anos de forma a acompanhar o ritmo da produção e consumo. Existem diversas formas de produzir vinho, há quem afirme que “o vinho é feito na vinha”, o que remete para a importância da qualidade das uvas. As características destas variam de ano para ano, e por isso, não existem decisões completamente certas ou erradas, apenas cabe ao enólogo escolher entre as técnicas disponíveis, ponderando as vantagens e as limitações de cada uma em determinadas condições (Jackson, 2008).

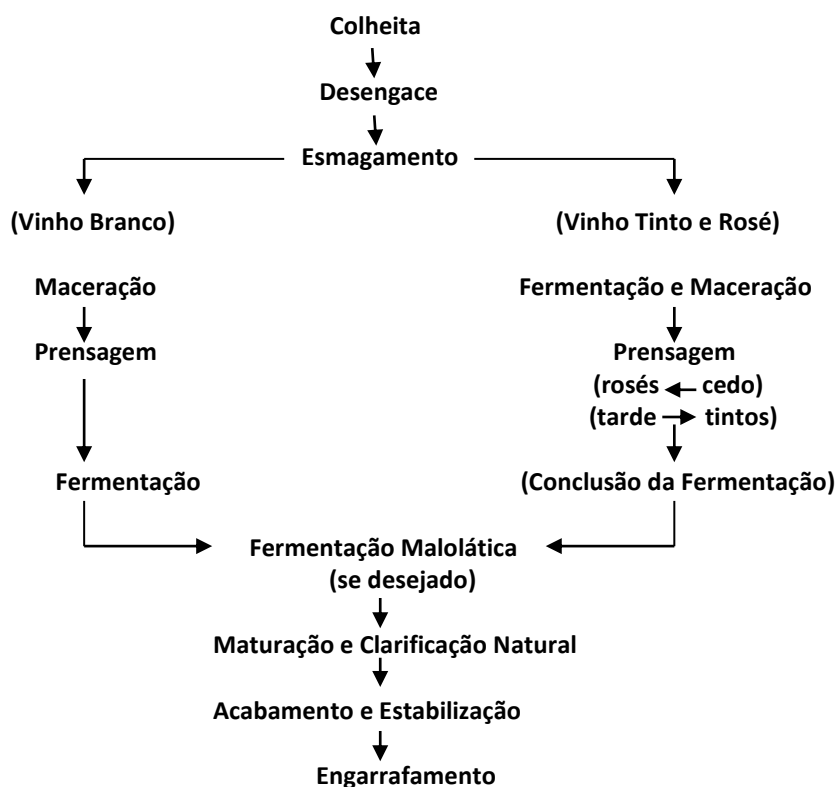


Figura 16 - Diagrama de produção de vinho (Adaptado de Jackson, 2008).

Para definir a época de colheita são determinados parâmetros como o teor de açúcares, a acidez total, o pH, o teor alcoólico e o teor em compostos fenólicos, principalmente em antocianinas e taninos (Carpena *et al.*, 2020a). A vindima deve ocorrer no momento certo, é necessário garantir que as uvas são colhidas a temperaturas baixas e entregues na adega em boas condições. Ao chegarem à adega, as uvas devem ser processadas o mais rápido possível para evitar deterioração e arranques de fermentação (Grainger & Tattersall, 2005).

A primeira etapa envolve a separação das uvas dos engaços (desengace) e de outros resíduos. Esta separação é bastante importante, pois a parte lenhosa confere sabores amargos e adstringência aos vinhos. De seguida, as uvas são ligeiramente esmagadas, nesta fase podem ser adicionados diversos produtos enológicos, nomeadamente o dióxido de enxofre, que funciona como um antioxidante minimizando as reações de oxidação e o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (Grainger & Tattersall, 2005). Dependendo das características da uva e do tipo de vinho que se pretende, as macerações podem ser mais ou menos prolongadas. No caso dos vinhos brancos, a maceração é mínima e raramente dura mais que algumas horas. Nos vinhos rosés, pode variar entre doze e vinte e quatro horas. Nos vinhos tintos, a maceração ocorre simultaneamente com a FA e demora vários dias. Este período de contacto do sumo com as películas, permite a extração de constituintes da polpa, película e sementes (Jackson, 2008). No caso dos vinhos brancos, após o período de maceração, o mosto é prensado para separar as películas e sementes do sumo, antes de se iniciar a FA. Nos vinhos tintos a prensagem realiza-se depois da FA (Pereira *et al.*, 2021).

A FA pode iniciar-se espontaneamente devido à presença de leveduras indígenas, ou de forma controlada, através da inoculação de uma estirpe de levedura com características conhecidas (Jackson, 2008; Pereira *et al.*, 2021). Chambers & Pretorius (2010), referem a importância das leveduras, o seu papel na produção de vinho e de como a biotecnologia pode contribuir para melhorar a qualidade desta bebida. No processo de vinificação, culturas puras de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* são adicionadas ao mosto. Isso garante maior controlo da vinificação, resultados mais previsíveis e diminui o risco de deterioração por outros microrganismos. Durante a FA dos vinhos, as leveduras convertem os açúcares das uvas em etanol, dióxido de carbono e um elevado número de metabolitos voláteis secundários, dependendo do metabolismo da levedura, afetando a composição do vinho nomeadamente a composição aromática e o teor em aminoácidos (Pereira *et al.*, 2021). Uma vez terminada esta fase, se for desejado, o vinho pode ser ainda submetido a uma fermentação malolática, em que o ácido málico é convertido em ácido láctico por ação de bactérias lácticas (Jackson, 2008). Os principais efeitos da fermentação malolática são a diminuição da acidez do vinho e uma modificação no aroma (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Todos os vinhos passam por um período de maturação e clarificação natural antes do engarrafamento. Além disso, o vinho sofre transformações físicas, químicas, e biológicas que mantêm ou melhoram os atributos sensoriais. Muitas dessas transformações ocorrem espontaneamente, mas podem ser induzidas pelo enólogo, através de processos de estabilização e envelhecimento (Jackson, 2008).

2.6. Envelhecimento de Vinhos

A conservação e envelhecimento do vinho é uma prática histórica levada a cabo ao longo de milénios por muitas civilizações, é uma técnica utilizada para conservar o vinho, mas também para valorizar as suas propriedades. O envelhecimento do vinho é o período que se inicia no final da vinificação e prossegue após o engarrafamento até ao consumo. Ao longo do processo, uma série de reações ocorrem resultando em alterações na composição química e nas propriedades organoléticas (Cassino *et al.*, 2018). Fatores como o *terroir*, ano de colheita ou “moda” influenciam as preferências dos consumidores, tornando-os mais propensos a comprar vinhos envelhecidos. O mercado para este tipo de produto tem vindo a crescer progressivamente em todo o mundo (Carpena *et al.*, 2020a; Echave *et al.*, 2021).

2.6.1. Em barricas e garrafas

De um modo geral, os vinhos passam inicialmente por um período em madeira, nomeadamente em barricas - ambiente oxidativo - uma vez que pequenas quantidades de oxigénio entram em contato com o vinho. Esta oxidação pode ser realizada de forma passiva, pela entrada de oxigénio através das aberturas das aduelas e microporos da madeira, ou ativamente, pela suplementação de oxigénio em pequenas quantidades (microoxigenação). Posteriormente, o envelhecimento poderá ocorrer em garrafa – ambiente redutor - onde a entrada de oxigénio é praticamente nula (del Álamo *et al.*, 2008); Yıldırı e Dündar., 2017; Carpena *et al.*, 2020b; Echave *et al.*, 2021).

Desde o século XVI, as espécies mais utilizadas em tanoaria são o carvalho (*Quercus alba*, *Quercus petraea* e *Quercus robur*) e o castanheiro (*Castanea sativa*). Entre a diversidade de espécies de carvalho, os carvalhos franceses e americanos são amplamente utilizados (del Álamo *et al.*, 2008; Martínez-Gil *et al.*, 2018; Carpena *et al.*, 2020b). Atualmente, apenas as madeiras *Quercus* e *Castanheiro* estão aprovadas pela OIV (Resolução OENO 4/2005). A madeira possui uma ligeira porosidade que permite uma transferência lenta de oxigénio que favorece a oxidação dos compostos e fenômenos físico-químicos que melhoram a cor e o sabor dos vinhos tintos (del Álamo *et al.*, 2008). Outras reações importantes que ocorrem durante o armazenamento em barricas são a condensação de taninos e flavonóis e diversas polimerizações. O grau e a extensão dessas reações dependem do tempo de armazenamento e da madeira. Alguns dos compostos mais relevantes transferidos para o vinho durante esta etapa são elagitaninos, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (Echave *et al.*, 2021). Os compostos voláteis extraídos da

madeira são principalmente compostos de furfural, guaiacol, lactona, eugenol, vanilina, siringaldeído e fenóis voláteis (Tao *et al.*, 2013).

Uma vez concluído o processo de envelhecimento oxidativo, o vinho é engarrafado em garrafas de vidro de volume variável (geralmente contendo 0,75 L de vinho), fechadas com rolhas de cortiça, através das quais o oxigénio é transferido para o seu interior (Echave *et al.*, 2021). As rolhas de cortiça encontram-se entre os vedantes mais utilizados, trata-se de um material que permite a permeabilidade ao oxigénio em pequenas quantidades, o que é importante para um envelhecimento gradual e adequado do vinho. Por outro lado, a cortiça não é um material inerte, permitindo a migração de alguns compostos para o vinho, nomeadamente ácidos fenólicos, aldeídos, taninos e polissacarídeos pécticos (Azevedo *et al.*, 2021). Diversos estudos referem a importância das rolhas e de como estas podem influenciar o processo de envelhecimento do vinho em garrafa (Lopes *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013; Crouvisier-Urien *et al.*, 2018; Furtado *et al.*, 2021).

O armazenamento adequado das garrafas é um elemento-chave para a preservação do vinho, como acontece com qualquer outro alimento e bebida, a temperatura, a humidade e a exposição à luz são conhecidos promotores da oxidação. Além disso, os vinhos engarrafados podem desenvolver defeitos não dependentes da oxidação ou contaminação microbológica, mas sim de compostos transferidos através das rolhas ou do ambiente da adega (Echave *et al.*, 2021). A temperatura aconselhada para armazenar vinho tinto, rosé e branco varia entre 14-18°C, 10-12°C e 8-12°C, respetivamente. Para temperaturas superiores, especialmente acima de 40° C, a qualidade do vinho degrada-se, originando sabores desagradáveis, sedimentação e cor acastanhada (van Wyk *et al.*, 2021). As consequências da temperatura elevada de armazenamento incluem a degradação de antocianinas, compostos aromáticos (tióis, ésteres, aldeídos) e instabilidade proteica. A luz, especialmente a luz ultravioleta é bem conhecida por induzir oxidação e produção de espécies oxidativas reativas. Assim, minimizar a exposição à luz é considerada uma condição vital para o armazenamento adequado do vinho. A humidade tende a diminuir a permeabilidade ao oxigénio das rolhas de cortiça. Como tal, uma humidade relativa de aproximadamente 70% é aceite como ótima para o armazenamento de garrafas de vinho. Estas, são tradicionalmente armazenadas na posição horizontal para atender às necessidades de espaço, mas também para limitar a oxidação excessiva. Do ponto de vista teórico, a taxa de transferência de gás será mais rápida quando a rolha está em contato com a fase gasosa no espaço superior da garrafa e mais lenta se em contato direto com o vinho (Echave *et al.*, 2021).

2.6.2. Métodos alternativos

Nas últimas décadas, novas abordagens têm sido desenvolvidas para o envelhecimento do vinho, nomeadamente a adição de madeira, micro-oxigenação, ultrassom e campos elétricos pulsados, como citadas na literatura: García Martín & Sun., 2013; Tao *et al.*, 2013; Yildiri e Dündar., 2017; Martínez-Gil *et al.*, 2018; Rubio-Bretón *et al.*, 2018 e Carpena *et al.*, 2020b.

2.6.3. Em profundidade

Outras práticas centram-se na fase de envelhecimento em garrafa, procurando chegar a aromas inovadores e únicos. Diversos investigadores estudaram os efeitos do envelhecimento em garrafa através da verificação das condições de armazenagem, na posição, tipo de vedante e estabilidade de compostos químicos (Ugliano, 2013; Carpena *et al.*, 2020b; Rossetti *et al.*, 2020; Vázquez-Pateiro *et al.*, 2020).

Uma abordagem inovadora para melhorar o envelhecimento em garrafa foi feita armazenando garrafas debaixo de água. A empresa espanhola “*Crusoe Treasure*” foi uma das primeiras adegas a usar esta nova abordagem, inspirada nas diferentes bebidas encontradas décadas ou séculos nos navios naufragados (Figura 17).

Os vinhos são mantidos 20 m abaixo do nível do mar durante pelo menos 6 meses, após o envelhecimento em barricas. O vinho resultante atinge um aroma bastante complexo, tornando-se num produto único e de valor acrescentado (Palacios *et al.*, 2014; Carpena *et al.*, 2020b).



Figura 17 - Submersão de garrafas de vinho no fundo do mar pela empresa *Crusoe Treasure* (Retirado de: Kassam, 2021).

Segundo Palacios *et al.*, (2014), os vinhos submersos apresentam características ligeiramente diferentes dos vinhos mantidos em cave. Isso deve-se às condições únicas envolvidas no envelhecimento em profundidade, nomeadamente:

Temperatura: O calor específico da água relativamente elevado, confere ao mar a capacidade extraordinária de armazenar calor e manter a temperatura relativamente estável, não só durante o ciclo entre o dia e noite, mas também durante o ciclo das estações ao longo do ano. As pequenas, mas frequentes mudanças térmicas aumentam a velocidade das transformações químicas que ocorrem no vinho, o que influencia as propriedades sensoriais finais (Palacios *et al.*, 2014).

Luminosidade: A exposição do vinho a radiação solar ou a fontes artificiais pode originar, por exemplo, radicais livres que causam a oxidação prematura do vinho e, conseqüentemente, aceleram a sua deterioração (Cassino *et al.*, 2018). De forma a mitigar os efeitos nefastos da luminosidade, as garrafas são mantidas no escuro, em caves ou armazéns controlados. No mar a radiação solar propaga-se poucos metros abaixo da sua superfície principalmente nas zonas costeiras, como apresentado na Figura 18 (Prazeres e Renema, 2018). Quando a luz se propaga num meio aquoso a sua intensidade diminui devido ao fenómeno de absorção, ou seja, a energia da luz é convertida em outro tipo de energia, geralmente calor ou energia química. Essa absorção é produzida por algas, que utilizam a luz como fonte de energia, material orgânico e inorgânico suspenso, compostos inorgânicos dissolvidos e a própria água.

A colisão do feixe de luz com as partículas em suspensão, provoca também reflexão e dificulta a penetração da luz. Assim, o mar poderá proteger as garrafas da luminosidade durante o envelhecimento em profundidade, principalmente nas zonas costeiras mais ricas em materiais em suspensão e matérias orgânicas.

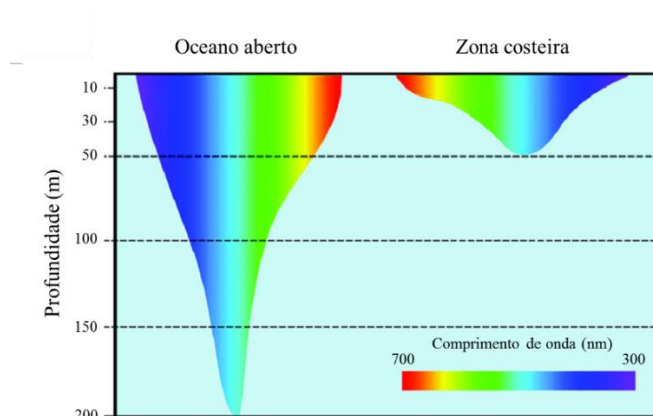


Figura 18 - Penetração da luz em oceano aberto e em zonas costeiras (Adaptado de Prazeres e Renema, 2018).

Pressão: O processamento do vinho a pressões superiores à pressão atmosférica (entre 100 e 600 MPa) tem sido estudado com o objetivo de inativar agentes patogénicos e manter a qualidade do vinho por mais tempo (Lukić *et al.*, 2020; van Wyk *et al.*, 2021). A aplicação de elevadas pressões demonstrou também ter um efeito de aceleração do envelhecimento do vinho, resultando em menores tempos de estágio (Nunes *et al.*, 2017). No entanto, a pressão aumenta com a profundidade, e segundo Palacios *et al.*, (2014), pressões superiores a 3 bar durante longos períodos de tempo poderão ter algum tipo de efeito no vinho.

A taxa de transferência de oxigénio poderá ser maior em condições subaquáticas, devido à ação conjunta das Leis de Henry e Dalton e à relativa permeabilidade da rolha ao oxigénio, aumentando o potencial *redox* do vinho conduzindo à co-pigmentação e a estabilização da cor dos vinhos tintos.

Movimentação: O mar é uma fonte de energia que está disponível em diferentes formas: energia marinha, energia osmótica devido à alta concentração de sal, energia térmica oceânica, energia das marés, que movimenta a água ritmicamente de acordo com os ciclos lunares e energia das ondas. Essa energia reverte-se nas garrafas, produzindo um efeito vibratório contínuo.

Segundo Palacios *et al.*, (2014), a análise sensorial demonstrou que o vinho apresenta uma maior intensidade de cor e brilho, em termos aromáticos sem reduções evidentes, diminuição dos aromas herbáceos e vegetais, maior intensidade, complexidade e concentração aromática, destacando os aromas primários de frutas e florais e também minerais, maior volume e frescura, menor adstringência revelando-se um vinho equilibrado em termos de acidez. Nos restantes vinhos provados, a preferência hedónica foi sempre a favor das amostras submersas.

O envelhecimento em profundidade produz, entre outras modificações, alterações na estrutura fenólica do vinho. A principal diferença centrou-se no parâmetro antocianina, sendo maior nos vinhos submersos. Outro parâmetro diferenciado foi a estabilidade tartárica, visto que é positiva em vinhos submersos e negativa em algumas amostras terrestres. Na maioria dos casos, o conteúdo de oxigénio aumenta nos vinhos submersos, por sua vez provoca um aumento no potencial *redox*. Quanto à pressão medida nas garrafas em geral, observou-se uma diminuição na pressão. Esta nova metodologia também está a ser explorada por outras adegas em todo o mundo, mas de momento não existem dados publicamente disponíveis sobre o processo ou a composição química de vinhos submersos (Palacios *et al.*, 2014; Carpena *et al.*, 2020b).

2.7. Determinação da Cor do Vinho – Métodos convencionais

A cor dos vinhos é uma característica muito importante. Para além de ser o primeiro atributo a ser avaliado pelos consumidores, fornece informações sobre a idade do vinho, o seu estado de conservação, possíveis defeitos e qualidades (Esparza *et al.*, 2009; De Freitas *et al.*, 2017). A cor é um atributo sensorial que está relacionado com os compostos fenólicos presentes nos vinhos, nomeadamente ácidos hidrocínâmicos e flavano-3-ol nos vinhos brancos e antocianinas no caso dos vinhos rosés e tintos. Consoante as características das uvas, técnicas de vinificação e diversas reações químicas que ocorrem durante a vinificação e envelhecimento a cor dos vinhos altera-se. No entanto, a tonalidade (TC) e a intensidade da cor (IC) podem dar informação sobre possíveis defeitos ou qualidades de um vinho, tendo sempre em atenção que a cor é um atributo da visão e, portanto, corresponde a uma sensação psíquica (Cabrita *et al.*, 2003). Em adegas e laboratórios de enologia, análises de rotina para determinar a cor dos vinhos são essenciais para garantir a qualidade ao longo do processo de produção e armazenamento. Com a necessidade de medir qualitativamente e quantitativamente a cor, foram utilizados ao longo dos anos os índices de Sudraud, de Roubert e de Glories (Sudraud, 1958; Roubert, 1977; Glories, 1984).

Segundo Sudraud (1958), para a IC e a TC apenas contribuíam as cores vermelha e amarela, sendo medidas as absorvâncias a 420 nm e 520 nm. O espectro dos vinhos tintos, apresenta um máximo de absorvância aos 520 nm, devido às antocianinas e às suas combinações sob a forma de ião flavilium, que diminuem com o envelhecimento, aumentando a absorvância aos 420 nm, na região dos amarelos e castanhos (Bakker *et al.*, 1986), conforme ilustrado na Figura 19.

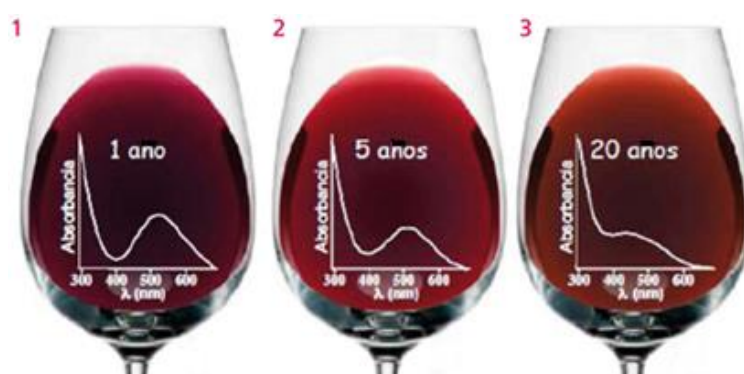


Figura 19 - Evolução da cor em vinhos tintos (Adaptado de Marin, 2013).

Em 1984, Glories referiu que nos vinhos tintos jovens, a componente azul, devido às formas quinonas das antocianinas livres e combinadas não poderiam ser descuradas nesta análise, passando-se a considerar também o comprimento de onda de 620 nm.

A IC dos vinhos tintos passa então a ser calculada pelo Método de Glories, correspondendo assim à soma das absorvâncias medidas aos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm, correspondendo às cores amarela, vermelha e azul (Equação 1).

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (1)$$

A TC é definida como o quociente da absorvância a 420 nm pela absorvância a 520 nm (Equação 2).

$$TC = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (2)$$

Os vinhos que apresentam valores de tonalidade iguais ou inferiores a 0,6, são considerados vinhos jovens, com pouco tempo de maturação (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

A CIE - *Commission Internationale de L'Éclairage* – estabeleceu sistemas de cor como CIEXYZ, CIELUV e o CIELAB, métodos precisos que permitem uma definição mais precisa das propriedades cromáticas, o CIELAB é um dos métodos mais utilizados (Bakker et al., 1986; Hernández et al., 2010), mas ainda não foi difundido como prática rotineira em adegas para avaliação da qualidade do vinho (Esparza et al., 2009).

2.8. Análise dos Compostos Voláteis

A análise da componente volátil em vinhos é necessária, uma vez que esses compostos contribuem significativamente para a perceção geral do consumidor sobre a qualidade (Castro et al., 2008), determinando a aceitação ou rejeição do produto (Marín-San Román et al., 2021).

O método analítico consiste em várias etapas, como preparação da amostra, separação, detecção, identificação e análise de dados. A preparação da amostra (extração, pré-concentração, fracionamento e isolamento) é a etapa que normalmente requer mais tempo durante o procedimento analítico (Marín-San Román et al., 2021).

As técnicas de extração para a identificação e quantificação de compostos voláteis baseiam-se: **a)** na volatilidade dos analitos (extração por *headspace*, destilação); **b)** solubilidade dos analitos em solventes orgânicos (extração *soxhlet*, extração líquido-líquido (LLE), extração com fluido supercrítico (SFE), extração em fase sólida (SPE), extração assistida por ultrassom (UAE) e extração assistida por micro-ondas (MAE)); **c)** na absorção/adsorção do analito em um

determinado material (extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração sorptiva com barra de agitação (SBSE) e extração dinâmica em fase sólida (SPDE) ou **d**) em combinações destas (Castro *et al.*, 2008; Marín-San Román *et al.*, 2021).

A separação dos compostos voláteis é realizada através de cromatografia gasosa (GC) técnica que nos últimos anos tem apresentado grandes avanços (Castro *et al.*, 2008; Marín-San Román *et al.*, 2021). A deteção e identificação dos compostos voláteis pode ser feita com diferentes tipos de detetores, mas a espectrometria de massa é atualmente a única técnica que para além de detetar um composto nos permite identificar, ou pelo menos tentativamente identificar esse composto. Esta identificação pode ser feita com recurso ao tempo de retenção do composto, mas também por comparação do espectro de massa desse composto com o espectro de massa existente em bibliotecas. O cálculo dos índices lineares de Kovats também são mais uma ferramenta para uma correta identificação dos compostos.

Finalmente é necessário considerar uma quantificação dos compostos identificados. A quantificação pode ser feita através de retas de calibração, quando existem padrões disponíveis, mas quando se trabalha com SPME, geralmente opta-se por uma semi-quantificação, que é o cálculo da área de cada pico (em %) relativamente à área total do cromatograma.

2.8.1. Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME foi desenvolvida na década de 90 por Pawliszyn e Arthur, consiste numa técnica de extração composta por uma fibra de sílica fundida revestida com um material polimérico absorvente (fase estacionária), inserida num dispositivo em forma de uma seringa (Marín-San Román *et al.*, 2021).

O procedimento da SPME é dividido em duas etapas: a extração e dessorção dos analitos. Na primeira etapa ocorre a extração dos analitos: a amostra é colocada num frasco selado com um septo e uma cápsula. Com a fibra retraída a agulha perfura o septo, em seguida o êmbolo é acionado e a fibra entra em contacto a amostra. Através de um processo de sorção os analitos aderem à fibra, dando-se a extração. Na segunda etapa ocorre a dessorção, a fibra é retirada do frasco e introduzida (manual ou automaticamente) no injetor do sistema cromatográfico, onde ocorre a dessorção dos analitos, por ação da temperatura (Castro *et al.*, 2008; Marín-San Román *et al.*, 2021).

Existem alguns parâmetros que podem ser otimizados para aumentar a eficiência da extração nomeadamente, o modo de operação: a fibra de SPME pode ser introduzida na amostra de duas maneiras diferentes: por imersão direta na solução (DI-SPME), ou por espaço de cabeça (HS-SPME).

•**DI-SPME:** a fibra é imersa diretamente na amostra líquida. Após o equilíbrio de distribuição entre os analitos e a fase estacionária ser alcançado, os analitos adsorvidos são analisados. Em imersão, a vida da fibra é menor devido ao contato com a amostra, adição de sais, ajuste de pH e compostos coexistentes na matriz. É mais sensível e mais adequado para a extração de voláteis e semivoláteis em amostras líquidas do que HS-SPME.

•**HS-SPME:** a fibra é exposta a amostras gasosas ou à fase de vapor localizada acima de uma amostra líquida ou sólida. Uma vez atingido o equilíbrio entre a fase vapor e a fase estacionária, os analitos são isolados em determinada temperatura e posteriormente analisados. A vida útil da fibra é maior do que no DI-SPME, pois não está em contato com a amostra. Esta técnica é mais adequada para a extração de compostos de alta volatilidade em amostras gasosas, aquosas e sólidas. No entanto, é uma técnica pouco sensível para isolar compostos semivoláteis, e os resultados obtidos podem não estar relacionados com a concentração real na matriz (Marín-San Román *et al.*, 2021).

Existem também fases mistas que possuem propriedades intermediárias e complementares de acordo com sua polaridade e capacidade de retenção. Alguns exemplos de fases mistas são: polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), polietilenoglicol/polidivinilbenzeno (CW/DVB), carboxeno/polidivinilbenzeno (CAR/ DVB), polietilenoglicol/resina temperada (CW/TRP), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) e polidivinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Marín-San Román *et al.*, 2021). Existe um equilíbrio de partição de analitos entre a matriz e a fase estacionária. A relação entre o analito na fase estacionária e o analito na amostra é chamada de coeficiente de partição. A concentração de analito na fibra ou fase estacionária aumenta muito rapidamente no início, depois aumenta mais lentamente até que o equilíbrio seja alcançado. Quanto mais espessa for a fase estacionária da fibra, mais concentração de analito será retida e mais tempo levará para estabelecer o equilíbrio. Em amostras gasosas, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é menor do que em amostras aquosas e sólidas. Por este motivo, é recomendado o uso de HS-SPME quando os analitos são suficientemente voláteis ou quando as amostras apresentam muitas impurezas (Marín-San Román *et al.*, 2021).

Para além do modo de operação e do tipo de revestimento da fibra, outras condições de extração devem ser otimizadas nomeadamente: a temperatura e o tempo de extração, a adição de sais, o pH, a velocidade de agitação da amostra e volume de amostra. A etapa de dessorção também pode ser otimizada nomeadamente, o tempo e a temperatura de dessorção (Castro *et al.*, 2008; Marín-San Román *et al.*, 2021).

As principais vantagens desta técnica são a simplicidade e rápida utilização, reduzido volume e tempo de preparação da amostra, não necessita de solventes orgânicos ou elevadas temperaturas de extração, é um método económico e versátil pode ser utilizado em amostras sólidas, líquidas e gasosas.

A temperatura de operação, a quebra da fibra, a decapagem do revestimento, o custo das agulhas e a existência de compostos de alto peso molecular que podem ser irreversivelmente ligados à fibra, são referenciados como algumas das desvantagens (Castro *et al.*, 2008; Marín-San Román *et al.*, 2021).

2.8.2. Extração Líquido-Líquido (LLE)

A extração líquido-líquido é uma técnica baseada na diferença de solubilidade do analito entre a amostra aquosa e um solvente orgânico imiscível em água. Os solventes com maior capacidade de extração são o diclorometano, éter dietílico, *n*-pentano, *n*-hexano (Marín-San Román *et al.*, 2021). Apesar de existirem técnicas com maior seletividade e sensibilidade, a LLE é amplamente utilizada em química analítica e é uma das técnicas mais utilizadas para a extração de compostos voláteis em vinho e bebidas alcoólicas. As principais vantagens desta técnica são a possibilidade de extração de compostos com diferentes volatilidades e polaridades e o reduzido volume de amostra utilizado. Contudo, requer a utilização de elevadas quantidades de solvente orgânico, que pode interferir com a análise cromatográfica, poluição ambiental, perda de analitos e trata-se de uma técnica morosa (Marín-San Román *et al.*, 2021). Também requer otimização da extração, nomeadamente é necessário escolher o melhor solvente (ou mistura de solventes) para cada caso, o volume de amostra e o volume de solvente, o tempo de extração, entre outros fatores.

Capítulo 3 | Materiais e Métodos

Para avaliar o impacto do envelhecimento nos vinhos em profundidade, foram analisadas nove amostras de Vinho Tinto Regional Península de Setúbal da casta *Cabernet Sauvignon* do ano de 2017, fornecidos pela Herdade Canal Caveira (Figura 20).



Figura 20 - Amostras de vinho analisadas.

As nove amostras correspondem a três garrafas de cada modalidade de envelhecimento (VT, VP1 e VP2), sendo que se trata do mesmo lote de vinho, engarrafado nas mesmas condições, sendo apenas o envelhecimento diferenciado. As garrafas foram sempre mantidas em cave, com exceção dos sete meses, em que estiveram mergulhadas. As amostras foram analisadas em julho de 2021.

Na Tabela 1, são apresentados os dados referentes às amostras utilizadas neste estudo.

Tabela 1– Características dos vinhos analisados no estudo.

Código da Amostra	Tipo de Vinho	Casta	Ano de Produção	Estágio	Duração
VT	Tinto	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2017	Em cave	---
VP1	Tinto	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2017	Profundidade no mar	7 meses, de 10/07/2019 a 28/02/2020
VP2	Tinto	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2017	Profundidade no mar	7 meses, de 28/02/2020 a 30/09/2020

3.1. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Com o objetivo de conhecer as características dos vinhos, foi realizada uma análise sumária dos parâmetros físico-químicos, nomeadamente teor alcoólico (% vol.), acidez volátil (g ácido acético/L), acidez total (g ácido tartárico/L), SO₂ livre (mg/L), SO₂ total (mg/L) e pH que são descritos de seguida.

3.1.1. Determinação do Teor Alcoólico – Método de Ebulliometria

Entende-se por teor alcoólico em volume (ou título alcoométrico volúmico) de um vinho, o número de litros de etanol contido em 100 litros de vinho, sendo estes dois volumes medidos à temperatura de 20°C, sendo expresso pelo símbolo % vol (Método OIV-MA-AS312-01A). O método baseia-se na determinação da temperatura de ebulição do vinho, intermédia entre a da água (100°C, sob uma pressão de 760 mm de mercúrio) e do etanol (78,4°C também sob uma pressão de 760 mm de mercúrio), estando estas diretamente relacionadas com o respetivo teor alcoólico em volume. Uma das ações interferentes relaciona-se com a influência da pressão atmosférica na temperatura de ebulição da água (antes da determinação referente à amostra), cujo valor se realiza a aferição da régua de medida do aparelho.

3.1.2. Determinação da Acidez Volátil – Método Oficial: Cazenave

Consiste na separação dos ácidos voláteis presentes no vinho por arrastamento numa corrente de vapor seguida de retificação, condensação e titulação. Parâmetro analisado segundo o método OIV-MA-AS313-02 – Acidez Volátil.

3.1.3. Determinação da Acidez Total – Titulação potenciométrica

Entende-se por acidez total de um vinho, a acidez titulável a pH 7, excluindo-se o dióxido de carbono. Procede-se a uma titulação de hidróxido de sódio até pH 7, a partir do volume gasto de NaOH é definida a quantidade de ácido tartárico, em g/L de ácido tartárico. Para a determinação deste parâmetro foi utilizado um titulador automático *Crison Compact Tritator*.

3.1.4. Determinação do Dióxido de Enxofre Livre e Total – Titulação iodométrica

Segundo a OIV (OIV,2021), o SO₂ livre é definido como o dióxido de enxofre presente no mosto e nos vinhos nas formas: H₂SO₃ e HSO₃⁻. O SO₂ total é o conjunto de todas as formas, livres e combinadas, de dióxido de enxofre presentes no vinho. Para a determinação deste parâmetro foi efetuada uma titulação iodométrica, recorrendo a um titulador automático *Crison Compact Tritator*.

3.1.5. Determinação do pH

Este parâmetro foi determinado com recurso a um potenciómetro, marca *Crison Compact Tritator*, com base na diferença de potencial entre dois elétrodos imersos na amostra, sendo que um elétrodo apresenta um potencial em função do líquido no qual está imerso, enquanto o outro tem um potencial fixo e conhecido, e constitui o elétrodo de referência. Este parâmetro foi avaliado tendo em conta o método OIV-MA-AS313-15-pH.

3.2. Composição fenólica e cor – Espectrofotometria UV-VIS

3.2.1. Intensidade e Tonalidade da Cor

A análise da cor dos vinhos foi realizada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível. Foi utilizado um espectrofotômetro DR 5000 HACH LANGE e cuvetes de Quartzo de 1 mm de percurso ótico

A Intensidade da Cor (IC) foi calculada pela soma da leitura das absorvâncias a 420 nm, 520 nm e 620 nm (Glories, 1984), de acordo com a Equação 3.

$$IC (ua) = A_{420nm} + A_{520nm} + A_{620nm} \quad (3)$$

A Tonalidade da Cor (TC) corresponde ao quociente entre a absorvância a 420 nm e a absorvância a 520 nm (Sudraud, 1958), calculada conforme Equação 4.

$$TC (ua) = A_{420nm} / A_{520nm} \quad (4)$$

Os resultados são expressos em unidades de absorvância (ua).

3.2.2. Índice de Polifenóis Totais – Índice de Folin-Ciocalteu (IF)

A determinação do Índice de Polifenóis Totais foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Depois das amostras de vinho serem centrifugadas durante 10 minutos a 10 000 rpm, colocou-se 1 ml de amostra para um balão volúmetrico de 50 ml e perfez-se com água destilada, obtendo-se uma diluição de 1:50. Num balão volumétrico de 20 ml, foram adicionados 2 ml da amostra diluída anteriormente e 10 ml de solução Folin-Ciocalteu a 10%. Aguarda-se três ou quatro minutos e junta-se 8 ml de solução de carbonato de sódio anidro a 75 g/L. Tapa-se o balão e faz-se a homogeneização da amostra. Após os 90 minutos, foi determinada a absorvância das soluções no espectrofotômetro UV-Vis a 700 nm, numa célula de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

Paralelamente foi realizado um ensaio em branco, seguindo o mesmo procedimento para as amostras mas ao qual foi adicionado 2 mL de água destilada. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. Após determinadas as absorvâncias, o Índice de Polifenóis Totais foi calculado através da Equação 5:

$$\text{Índice de Folin-Ciocalteu (IF)} = Abs_{700nm} \times 100 \quad (5)$$

3.2.3. Determinação das Antocianinas Livres (AL)

As antocianinas livres foram previamente separadas por um Sep-Pak e diluídas em etanol clorídrico, utilizou-se uma diluição de 10x. As absorvâncias foram lidas no espectrofótopmetro com um varrimento entre 510 nm e 560 nm, com intervalos de 5 nm. Utilizando uma célula de 1 cm de percurso óptico. Todas as amostras foram lidas em duplicado. E o branco feito com etanol clorídrico. Esta determinação baseia-se no método proposto por Di Stefano *et al.*, (1989). A concentração de antocianinas livres (mg malvidina / dm³) é dado pela Equação 6:

$$AL = \text{Abs max visível} \times 26,6 \times \text{diluição} \quad (6)$$

3.2.4. Determinação Flavonóides Totais (FT), Flavonóides não Antociânicos (FnA) e Antocianinas Totais (AT)

Os FT, FnA e AT foram determinados segundo Di Stefano *et al.*, (1989). Procedeu-se primeiramente a preparação do reagente de etanol clorídrico. Para isso, juntou-se num balão volumétrico de 100 cm³, 70 cm³ de etanol, 30 cm³ de água destilada e 1 cm³ de ácido clorídrico. De seguida, dilui-se o vinho com o etanol clorídrico, a uma diluição de 1/25, em que se mediu 0,8 cm³ da amostra para um balão volumétrico de 20 cm³ e completou-se o volume com etanol clorídrico. Por fim, procedeu-se a leitura das absorvâncias, numa célula de quartzo de 1 cm de percurso óptico, com um varrimento entre 230 nm e 600 nm, com intervalos de 5 nm, frente a um branco de etanol clorídrico. As amostras foram lidas em duplicado.

Realizadas todas as leituras, os espectros foram inseridos em folha de Excel, e traçaram-se gráficos (Figura 21), a partir dos quais foram efetuados os seguintes cálculos, de acordo com as seguintes equações:

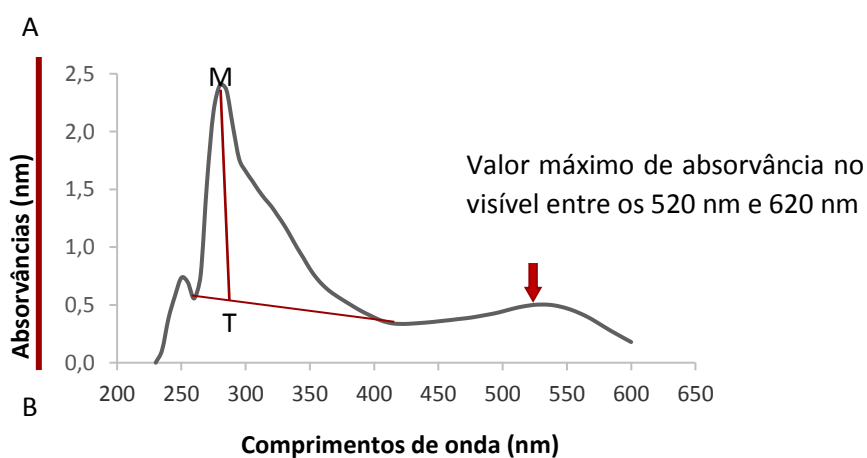


Figura 21 - Gráfico ilustrativo para determinar a concentração de Flavonóides Totais, Flavonóides não Antociânicos e Antocianinas Totais.

$$E_{a\ 280} = \text{Abs máx. visível}/3,5 \quad (7)$$

$$E'_{280} = (MT/AB) \times E_T \quad (8)$$

$$E''_{280} = E'_{280} - E_{a\ 280} \quad (9)$$

Onde:

MT – representa a distância da reta MT em cm;

AB – representa a distância da reta AB em cm;

Et – representa o valor máximo de absorvância apresentado na reta AB.

Após efetuar os cálculos, procedeu-se a determinação da concentração dos FT, FnA e AT, através das seguintes equações:

$$FT \text{ (mg catequina/dm}^3\text{)} = E'_{280} \times 82,4 \times \text{diluição} \quad (10)$$

$$FnA \text{ (mg catequina/dm}^3\text{)} = E''_{280} \times 82,4 \times \text{diluição} \quad (11)$$

$$AT \text{ (mg malvidina/dm}^3\text{)} = \text{Abs } 540 \times 26,6 \times \text{diluição} \quad (12)$$

3.3. Análise dos Compostos Voláteis

3.3.1. Extração em HS-SPME

Para a preparação das amostras foi adotado o procedimento descrito por Martins *et al.*, (2018) adaptado a este trabalho. Foram introduzidos 5,0 mL de amostra e 0,6 g de NaCl num frasco de 20 mL, selado com um septo de borracha revestido de *teflon*, com tampa de rosca magnética. A adição de NaCl permite uma melhor eficiência de extração pois aumenta a força iónica da solução diminuindo a solubilidade dos analitos, que passam mais facilmente para o espaço de vapor (Canuti *et al.*, (2009)). A amostra foi equilibrada durante 5 min a 30°C, e a extração dos analitos ocorreu durante 15 min à mesma temperatura, com agitação a 250 rpm. A dessorção térmica dos analitos foi realizada expondo a fibra na porta de injeção do GC a 260 °C por 3 min em modo *splitless*, pelo mesmo período de tempo. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. Neste trabalho foi utilizada a fibra de adsorção divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA, USA), cuja fase estacionária (revestimento) tem uma espessura de 50/30 µm. Antes da utilização, a fibra foi condicionada seguindo as recomendações do fabricante.

3.3.2. Extração Líquido-Líquido

Adaptando o protocolo anteriormente descrito por Vilanova *et al.*, (2011), foi adicionado 10 µL de padrão interno (3-octanol) e 400 µL diclorometano puro a 8 ml de vinho. Agitou-se com barra magnética durante 15 min sem que houvesse produção de espuma ou emulsão. Colocou-se no congelador durante 10 min, centrifugou-se durante 6 min a 5000 rpm durante 4°C, retirou-se a fase orgânica, para um vial GC com auxílio de uma micropipeta. Adicionou-se sulfato de sódio anidro para eliminar a água que a amostra podia conter, colocou-se o extrato em outro vial pronto a analisar. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. Foi injetado 1 mL de cada amostra.

3.3.3. Análise Cromatográfica

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent 8890 GC System, acoplado a um amostrador automático SepSolve Analytical Sample Preparation Robot, com detetor de espectroscopia de massa BenchTOF-Select da Markes International (Figura 22). O *software* utilizado para controlo instrumental, aquisição e processamento de dados foi o TOF-DS™ da Markes International.



Figura 22 - Equipamento usado no estudo dos compostos voláteis.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma DB-WAX (60m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás de arraste utilizado foi o Hélio, a pressão constante de 35 Psi.

O programa de temperaturas foi: 50°C durante 4 minutos, seguido de um aumento de 4°C/min até 240°C, mantendo esta temperatura durante 5 min, aumentando depois 4°C/min até aos 250°C, durante 6 min. A temperatura da linha de transferência do MS e da fonte era de 250°C. Periodicamente, foram executados brancos à fibra para garantir a ausência de contaminantes e/ou efeito de memória.

3.3.4. Identificação e quantificação dos compostos

Os compostos voláteis foram identificados com auxílio da biblioteca NIST e valores do índice de retenção (RI). Os espectros de massa foram comparados com a NIST MS Search Program Version 2020. Para determinar os fragmentos de massa a ionização electrónica (EI) foi ajustada a 70 eV e os espectros registados entre 40 e 450 Da. Para determinar o Índice de Kovats dos compostos presentes nas amostras, foi anteriormente injetado nas mesmas condições cromatográficas, uma mistura de padrões de alcanos (C₇-C₃₀), fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA, USA). Esta mistura de alcanos originou um perfil cromatográfico na qual todos os picos e os respetivos tempos de retenção são conhecidos. Através do tempo de retenção e do número de átomos de carbono presente em cada composto é possível calcular os seus Índices de Kovats. Os Índices destes alcanos são utilizados como referência para o cálculo dos restantes índices de retenção dos picos nos cromatogramas, permitindo assim uma melhor identificação dos compostos e comparação com dados da literatura.

As quantidades relativas de componentes individuais são expressas como áreas de pico percentuais em relação à área total do pico. Desta forma, trata-se de uma semi-quantificação.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), considerando apenas como fator de variação a profundidade. O teste de comparação de médias utilizado foi o Fischer para um nível de confiança de 95%. A análise foi efetuada com recurso ao programa NCSS 11 *Statistical Software* (2016).

Foi ainda efetuada, com os valores significativamente diferentes dos compostos voláteis obtidos por SPME, uma análise canónica discriminante. Esta é uma análise não paramétrica, onde são geradas funções discriminantes que são combinações das variáveis que melhor discriminam grupos de amostras definidos *à priori*. É uma análise relacionada com a análise de componentes principais e correlação canónica. Neste trabalho e para esta análise, os grupos definidos *à priori* eram baseados no envelhecimento diferenciado: os vinhos VT, VP1 e VP2.

Capítulo 4 | Resultados e Discussão

4.1. Análises Físico-químicas

Foram analisados os parâmetros físico-químicos de todas as amostras com o objetivo de conhecer as características dos vinhos. Na Tabela 2 os valores apresentados correspondem à média de três garrafas em cada estágio, valores detalhados são apresentados no Anexo I.

Tabela 2 - Análise sumária dos vinhos envelhecidos em cave, profundidade 1 e 2 (VT, VP1 e VP2), respetivamente.

Parâmetro	Unidade	VT	VP1	VP2
Teor Álcool Adquirido	% vol.	14,0 ± 0,00 ^a	14,0 ± 0,00 ^a	14,0 ± 0,00 ^a
Acidez Total	g (Ácido Tartárico)/L	4,72 ± 0,03 ^a	4,68 ± 0,04 ^a	4,75 ± 0,09 ^a
Acidez Volátil	g (Ácido Acético)/L	0,49 ± 0,02 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	0,50 ± 0,02 ^a
pH	-----	3,88 ± 0,02 ^a	3,88 ± 0,01 ^a	3,87 ± 0,01 ^a
SO ₂ livre	mg/L	15 ± 1,15 ^a	17 ± 0,58 ^b	15 ± 1,15 ^a
SO ₂ total	mg/L	60 ± 3,79 ^a	68 ± 2,65 ^b	65 ± 0,58 ^b

Nota: Médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a $p < 0,05$.

Após observar os resultados obtidos na Tabela 2, podemos afirmar que todos os parâmetros analisados se encontram dentro dos limites legais exigidos (IVV, 2021).

Com os sete meses de envelhecimento em profundidade não foram observadas diferenças estatísticas entre os vinhos submersos e os vinhos que permaneceram em cave para os parâmetros: teor alcoólico (% vol.), acidez volátil (g ácido acético/L), acidez total (g ácido tartárico/L) e pH. O teor de SO₂ livre para todos os vinhos é semelhante, variando de 15 e 17 mg/L. No entanto, o SO₂ total mostra um ligeiro aumento, significativamente diferente, nos vinhos envelhecidos em profundidade.

4.2. Características Cromáticas

Com o envelhecimento, a cor dos vinhos tintos altera-se gradualmente de vermelho-cereja para um vermelho-escuro e finalmente para um vermelho-tijolo, vinhos mais velhos podem apresentar uma matriz laranja. Estas alterações são diferentes para cada vinho e dependem da sua composição química e das condições de armazenamento. Para avaliar o impacto do envelhecimento em profundidade nas características cromáticas dos vinhos, procedeu-se à determinação da intensidade da cor (IC), tonalidade da cor (TC), índice de polifenóis totais (IF), antocianinas livres (AL), flavonóides totais (FT), flavonóides não antociânicos (FnA) e antocianinas totais (AT).

Na Tabela 3 encontram-se os valores médios \pm desvio padrão, obtidos para cada parâmetro analisado, valores detalhados são apresentados no Anexo II.

Tabela 3 – Valores das médias \pm desvio padrão dos parâmetros IC, TC, IF, AL, FT, FnA e AT para VT, VP1 e VP2.

Parâmetro	Unidade	VT	VP1	VP2
IC	ua	1,11 \pm 0,01 ^{ab}	1,11 \pm 0,02 ^a	1,12 \pm 0,01 ^b
TC	ua	0,89 \pm 0,00 ^a	0,88 \pm 0,01 ^a	0,87 \pm 0,00 ^b
IF	ua	44,8 \pm 1,0 ^a	46,3 \pm 1,0 ^b	45,1 \pm 1,0 ^{ab}
AL	(mg malvidina/dm ³)	44 \pm 4 ^a	49 \pm 2 ^b	51 \pm 2 ^b
FT	(mg catequina/dm ³)	6119 \pm 999 ^a	5632 \pm 429 ^a	5541 \pm 365 ^a
FnA	(mg catequina/dm ³)	5826 \pm 999 ^a	5329 \pm 428 ^a	5235 \pm 364 ^a
AT	(mg malvidina/dm ³)	332 \pm 5 ^a	343 \pm 8 ^b	346 \pm 5 ^b

Nota: Médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a $p < 0,05$.

A IC obtida pela soma da leitura das absorvâncias a 420 nm, 520 nm e 620 nm (Glories, 1984), varia muito de vinho para vinho, apresentando valores entre 0,3 e 1,8 (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Nos vinhos analisados a IC apresenta valores de 1,11 e 1,12. De acordo com a bibliografia consultada, durante o processo de envelhecimento dos vinhos, reações de polimerização e condensação de antocianinas e outros compostos fenólicos dão origem a uma

diminuição da IC. No entanto, Palacios *et al.*, (2014) verificaram um aumento na IC e brilho nos vinhos envelhecidos em profundidade no mar.

A TC é definida como o quociente da absorvância a 420 nm pela absorvância a 520 nm. Nos vinhos analisados a TC variou entre 0,87 e 0,89. Segundo Ribéreau-Gayon *et al.*, (2006b), a TC em vinhos jovens apresenta valores de 0,5 e 0,7 aumentando com o envelhecimento atingindo um limite de 1,2 a 1,3.

Os valores de IF encontram-se compreendidos entre 44,8 e 46,3, sendo que os vinhos envelhecidos em profundidade apresentam valores ligeiramente superiores. O mesmo se verifica para as AL, estas variam de 44 a 51 mg malvidina/dm³, apresentando diferenças significativas entre si, e ligeiramente superiores nos vinhos envelhecidos em profundidade.

A análise estatística realizada para os FT e os FnA não revelou diferenças significativas. Os valores encontrados nestes vinhos para os FT variam de 5541 a 6119 mg catequina/dm³. O teor em FnA varia entre 5235 e 5826 mg catequina/dm³. Contudo, os vinhos que estagiaram em cave apresentam teores ligeiramente superiores aos vinhos envelhecidos em profundidade para ambos os parâmetros.

Em relação às AT, os valores variaram de 332 a 346 mg malvidina/dm³, sendo estes ligeiramente mais elevados no vinho envelhecido em profundidade. Palacios *et al.*, (2014), reportaram teores mais elevados de antocianinas nos vinhos envelhecidos em profundidade no mar comparados com os vinhos envelhecidos em cave.

Embora neste estudo as diferenças entre os vinhos sejam ténues, sabe-se que o envelhecimento provoca alterações ao nível da cor dos vinhos e da sua componente fenólica, devido à sua natureza altamente antioxidante, os compostos fenólicos possuem enorme capacidade de interagir com outras moléculas e podem se oxidar facilmente dependendo das condições a que os vinhos são submetidos.

Os resultados observados neste estudo são inversos aos observados por Monagas *et al.*, (2006), estes avaliaram a evolução do conteúdo fenólico de vinhos tintos de *Vitis vinifera* durante 26 meses de envelhecimento em garrafa, e constataram que embora os vinhos tenham apresentado diferenças nos seus perfis fenólicos iniciais, a tendência de evolução das diferentes classes de fenólicos foi semelhante nas três castas avaliadas (Tempranillo, Graciano e Cabernet Sauvignon). As antocianinas totais diminuíram em função da redução das antocianinas monoméricas, e verificou-se um aumento de catequinas, polifenóis altamente polimerizados e proantocianidinas, sugerindo reações de condensação durante o armazenamento em garrafa.

Durante o primeiro ano ocorrem as principais alterações no vinho, com o tempo as alterações da cor irão tender a ser cada vez menos notórias devido a diminuição das reações

ocorridas. Ao longo do processo de envelhecimento, as antocianinas precipitam devido a diversas reações químicas (redução, oxidação e polimerização) com outros compostos presentes no vinho, originando compostos mais estáveis (Ribéreau-Gayon et al., (2006b)). As consequências destas reações envolvendo os compostos fenólicos nos vinhos tintos são a alteração da intensidade de cor, desenvolvimento de uma tonalidade amarelo-laranja e modificações nos taninos, tornando os vinhos menos adstringentes.

Os resultados obtidos são preliminares e não se pode atribuir nenhuma relação específica ao envelhecimento em profundidade, mas sim a uma soma de fatores desconhecidos, nomeadamente: a composição química do vinho, o tempo de envelhecimento, a profundidade, a pressão, a temperatura, entre outros. Seria interessante analisar o vinho no fim da fermentação e antes de afundar as garrafas de vinho para compreender melhor a sua evolução.

4.3. Análise dos Compostos Voláteis

Neste trabalho pretendeu-se avaliar que alterações o vinho sofre ao nível da componente volátil com o envelhecimento em profundidade no mar, para isso comparou-se o vinho que estagiou em cave (VT) com amostras de vinho que foram submersas no mar (VP1 e VP2). Para a extração dos compostos foram utilizadas duas técnicas, a extração HS-SPME e LLE acoplada a cromatografia gasosa com deteção de espectrometria de massa de tempo de voo (GC/TOFMS). As amostras foram analisadas em triplicado, conforme descrito anteriormente.

Embora diversos procedimentos para a análise de compostos voláteis tenham sido descritos (Rocha *et al.*, (2004); Câmara *et al.*, (2006); Tao *et al.*, (2008); Canuti *et al.*, (2009); Martins *et al.*, (2018)), a comparação entre diferentes metodologias de extração com base no seu desempenho analítico ainda não está muito difundida (Castro *et al.*, (2004); Andujar-Ortiz *et al.*, (2006); Hernanz *et al.*, (2008)). Contudo, o objetivo deste trabalho não foi comparar o desempenho analítico das duas técnicas utilizadas, mas sim obter um maior número de compostos voláteis, compreender se técnicas de extração diferentes permitem identificar compostos distintos e avaliar alterações nos compostos voláteis com as diferentes condições a que os vinhos envelhecidos foram sujeitos.

Neste trabalho foram identificados no total 85 compostos, 36 pertencentes à família dos ésteres, 22 álcoois, 11 ácidos carboxílicos, 2 aldeídos, 1 acetal, 1 acetato, 1 cetona, 1 lactona, 1 composto de enxofre, 1 terpenóide, 1 norisoprenóide e 7 outros compostos. De acordo com a bibliografia consultada, os compostos identificados já foram referenciados em vinhos *Cabernet Sauvignon* (Gürbüz *et al.*, (2006); Tao *et al.*, (2008); Jiang & Zhang (2010)). Tendo em conta as amostras analisadas, verificou-se que o método HS-SPME foi mais sensível que a LLE. Na extração HS-SPME foram detetados 59 compostos voláteis incluindo 24 ésteres, 18 álcoois, 7 ácidos carboxílicos e 10 outros compostos, enquanto na LLE apenas foram detetados 47 compostos voláteis: 22 ésteres, 10 álcoois, 6 ácidos carboxílicos e 9 outros compostos.

A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos espectros de massa dos picos obtidos nos cromatogramas, representados na Figura 23 e Figura 24, através do programa TOF-DS™ da Markes International e os compostos foram identificados com auxílio da biblioteca NIST e valores do índice de retenção linear (RI). A quantidade relativa de cada composto foi calculada como a razão percentual da respetiva área de pico em relação à área total do pico e expressa em percentagem (%).

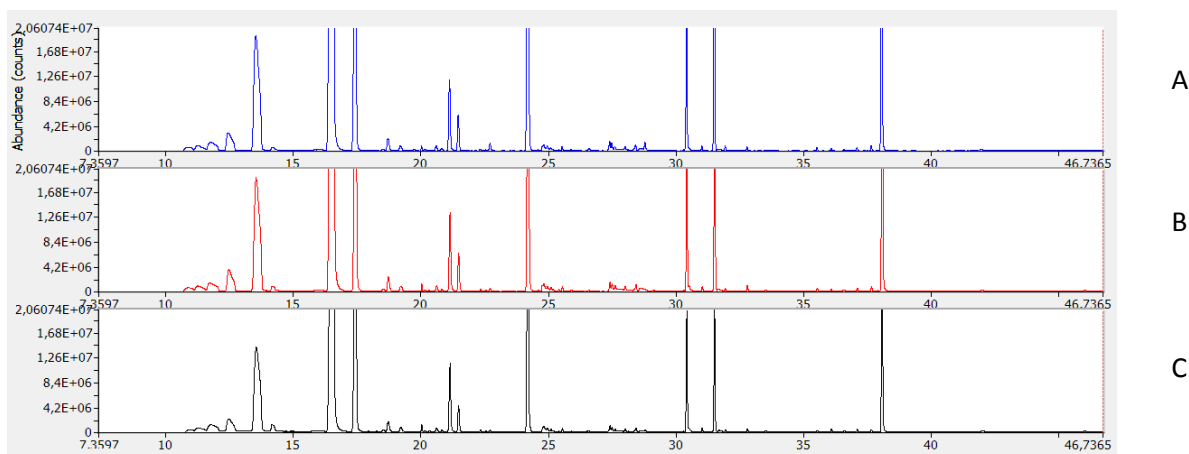


Figura 23 - Cromatogramas obtidos através de HS-SPME-GC/TOFMS. (A) - vinho envelhecido em cave (VT); (B) - vinho envelhecido em profundidade (VP1) e (C) - vinho envelhecido em profundidade (VP2).

De um modo geral, nos cromatogramas obtidos poderá haver alguma diferença em termos de composição volátil, mas não se mostra notória, principalmente nos compostos maioritários, não sendo de assinalar nenhuma alteração significativa nos perfis cromatográficos dos vinhos em estudo, no entanto são observadas algumas diferenças a nível quantitativo entre amostras.

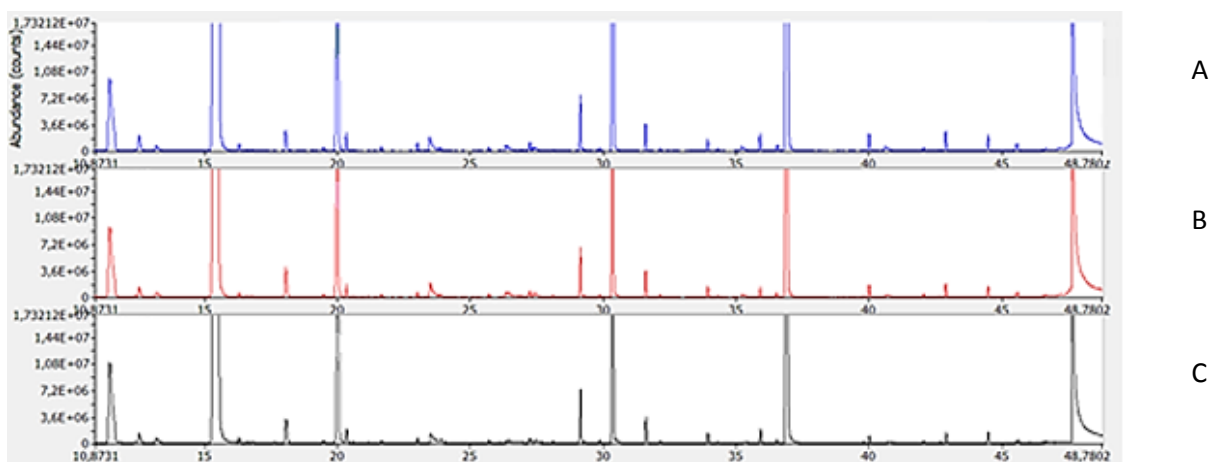


Figura 24 - Cromatogramas obtidos através de LLE-GC/TOFMS. (A) - vinho envelhecido em cave (VT); (B) - vinho envelhecido em profundidade (VP1) e (C) - vinho envelhecido em profundidade (VP2).

Os compostos identificados nos diferentes vinhos são apresentados em % de área de cada composto relativamente a área total do cromatograma da Tabela 4 à Tabela 11, consoante a técnica de extração. Nas tabelas, letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre amostras, de acordo com o teste de Fischer ($p < 0,05$).

A maioria dos ésteres encontrados no vinho são produzidos enzimaticamente durante a FA e durante o envelhecimento, por esterificação química entre um álcool e ácidos a pH baixo (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Sumbly *et al.*, 2010). Dos ésteres identificados, destacam-se o acetato de isoamilo, butanedioato de dietilo, ácido 2-hidroxiopropanóico e decanoato de etilo, estes compostos encontram-se presentes no vinho com áreas significativas, sendo responsáveis pelos aromas frutados e florais (Tabela 4 e Tabela 5). Outros ésteres foram identificados, nomeadamente 2-metilbutanoato de etilo, 3-metilbutanoato de etilo, hexanoato de metilo, acetoína, lactato de isoamilo, etil butil succinato, 3-metil-1-butil-butanedionato de etilo, 3-hidroxi-2,2-dimetil butanedionato de dietilo, 2-hidroxi pentanedionato de dietilo e 2-hidroxi-3-fenil propanoato de etilo.

Tabela 4 – Ésteres identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Ésteres								
Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	RI _{CAL}	RI _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
1	Butanoato de etilo	C ₆ H ₁₂ O ₂	10,8499	n.c.	1044	0,045±0,032	0,068±0,055	0,064±0,030
2	2-Metilbutanoato de etilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	11,2449	n.c.	1064	0,105±0,011	0,113±0,043	0,088±0,034
3	3-Metilbutanoato de etilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	11,7502	n.c.	1072	0,105±0,068	0,113±0,069	0,102±0,071
5	Acetato de isoamilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	13,5172	n.c.	1126	5,220 ±0,248	4,939±1,236	3,847±2,426
6	2-Metil butil éster	C ₉ H ₁₈ O ₂	15,9849	n.c.	1149	0,003±0,001	1,286±3,882	1,273±2,299
13	Octanoato de etilo	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	19,5162	n.c.	1294	0,008±0,001	0,009±0,004	0,022±0,041
17	Heptanoato de etilo	C ₉ H ₁₈ O ₂	20,8003	n.c.	1341	0,030±0,002	0,036±0,014	0,033±0,002
18	Ácido 2-hidroxiopropanóico	C ₅ H ₁₀ O ₃	21,1033	n.c.	1341	1,607±0,036	1,721±0,643	1,523±0,093
22	Heptanoato de etilo	C ₉ H ₁₈ O ₂	22,6838	1327	1394	0,038±0,005	0,049±0,016	0,077±0,039
28	Hexanoato de isopentilo	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	24,9346	1396	1460	0,044±0,005	0,046±0,018	0,041±0,005
35	3-Hidroxi butanoato de etilo	C ₆ H ₁₂ O ₃	26,8602	1460	1522	0,002±0,000	0,004±0,002	0,004±0,002
37	2-Hidroxi 4-metil pentanoato de etilo	C ₈ H ₁₆ O ₃	27,5833	1484	1545	0,027±0,004	0,043±0,019	0,040±0,008
38	Metanoato de octilo	C ₉ H ₁₈ O ₂	27,9833	1497	n.e.	0,037±0,004	0,044±0,017	0,044±0,004
39	Lactato de isoamilo	C ₈ H ₁₆ O ₃	28,3946	1511	1583	0,057±0,010	0,085±0,035	0,075±0,013
43	Decanoato de metilo	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	29,1259	1536	1614	0,002±0,001	0,003±0,001	0,204±0,605
44	Etil succinato de metilo	C ₇ H ₁₂ O ₄	30,2753	1575	1632	0,005±0,001	0,009±0,004	0,008±0,002
45	Decanoato de etilo	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	30,3924	1578	1643	2,074±0,176	2,163±0,847	1,782±0,192
47	3-metil octanoato de butilo	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	30,9915	1599	1670	0,056±0,003	0,063±0,024	0,057±0,004
48	Butanedioato de dietilo	C ₈ H ₁₄ O ₄	31,478	1616	1687	2,173±0,394	3,623±1,675	3,167±0,752
51	Etil-9-decanoato	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	31,9005	1631	1688	0,021±0,003	0,029±0,012	0,035±0,009
60	Etil butil succinato	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	34,7371	1735	n.e.	0,002±0,001	0,005±0,002	0,004±0,001
62	Decanoato de isobutilo	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	36,0553	1785	1643	0,029±0,002	0,025±0,009	0,017±0,002
65	3-Metil-1-butil-butanedionato de etilo	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	37,6219	1847	1892	0,042±0,008	0,072±0,036	0,070±0,014
69	Tetradecanoato de etilo	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	41,2335	1995	2043	0,003±0,001	0,004±0,001	0,002±0,000
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						11,735	14,552	12,579

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL}-índices de retenção calculados ; RI_{LIT} -índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a p<0,05.

Na Tabela 4, algumas diferenças estatísticas podem ser observadas entre os vinhos, de salientar o 3-hidroxi butanoato de etilo, o 2-hidroxi 4-metil pentanoato de etilo e o etil butil succinato, estes apresentam maior % de área nos vinhos envelhecidos em profundidade.

As áreas relativas (%) obtidas por LLE são superiores às obtidas por SPME, o mesmo foi reportado em Castro *et al.*, (2004). A SPME não se revelou um método eficaz para determinar a acetoína, o mesmo foi reportado no trabalho realizado por Andujar-Ortiz *et al.*, (2006) ao compararem a extração por LLE, SPE e SPME para identificar compostos voláteis em vinhos.

Tabela 5 – Ésteres identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	RI _{CAL}	RI _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
1	3-Metilbutanoato de etilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	10,8519	n.c.	1072	0,018±0,017	0,011±0,007	0,018±0,016
3	Hexanoato de metilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	12,5234	n.c.	1126	0,347±0,213	0,267±0,121	0,416±0,232
7	Hexanoato de etilo	C ₈ H ₁₆ O ₂	16,2735	n.c.	1239	0,090±0,058	0,063±0,030	0,102±0,060
11	Acetoína	C ₄ H ₈ O ₂	18,0409	n.c.	1287	0,618±0,381	0,682±0,176	0,458±0,195
15	Ácido 2-hidroxiopropanóico	C ₅ H ₁₀ O ₃	19,9971	n.c.	1341	7,630±2,784	6,774±1,659	6,058±3,635
16	Acetato de Isoamilo	C ₇ H ₁₄ O ₂	20,3168	n.c.	1382	7,001±20,095	0,217±0,084	0,303±0,104
17	Acetato de isopropilo	C ₅ H ₁₀ O ₂	20,5515	n.c.	1386	0,008±0,003	0,007±0,002	0,007±0,002
25	Octanoato de etilo	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	22,9878	1337	1441	0,095±0,063	0,067±0,032	0,118±0,068
34	3-hidroxi-butanoato de etilo	C ₆ H ₁₂ O ₃	25,6859	1421	1522	0,042±0,015	0,037±0,012	0,043±0,010
37	2-hidroxi-4-metil-pentanoato de etilo	C ₈ H ₁₆ O ₃	26,4142	1445	1545	0,084±0,047	0,073±0,025	0,083±0,027
40	Lactato de isoamilo	C ₈ H ₁₆ O ₃	27,2317	1472	1583	0,107±0,082	0,058±0,045	0,117±0,059
48	Butanedioato de dietilo	C ₈ H ₁₄ O ₄	30,3448	1577	1687	9,805±4,626	7,555±2,978	10,653±4,251
50	Acetato de Etilo	C ₄ H ₈ O ₂	32,1160	1639	1723	0,027±0,012	0,026±0,007	0,026±0,006
52	Pentanedionato de dietilo	C ₉ H ₁₆ O ₄	33,2172	1679	1768	0,002±0,002	0,001±0,001	0,002±0,002
53	2-fenil acetato de etilo	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	33,4652	1688	1785	0,003±0,002	0,002±0,001	0,003±0,002
54	Etil butil succinato	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	33,5850	1692	n.e.	0,006±0,004	0,003±0,002	0,006±0,005
60	3-metil-1-butil-butanedionato de etilo	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	36,5095	1803	1892	0,101±0,063	0,072±0,032	0,110±0,060
64	3-hidroxi-2,2-dimetil butanedionato de dietilo	C ₈ H ₁₄ O ₅	39,9893	1943	2060	0,217±0,107	0,190±0,077	0,260±0,086
71	2-hidroxi pentanedionato de dietilo	C ₉ H ₁₆ O ₅	42,8788	2065	n.e.	0,277±0,148	0,219±0,090	0,322±0,134
74	2-hidroxi-3-fenil propanoato de etilo	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	45,5646	2185	n.e.	0,133±0,097	0,100±0,048	0,161±0,098
76	2 fenil octanoato de etilo	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	46,5153	2228	2373	0,009±0,007	0,006±0,003	0,007±0,003
87	3-metoxi- 4-hidroxi benzoato de etilo	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	52,8918	2546	n.e.	0,017±0,012	0,012±0,006	0,019±0,013
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						26,637	16,442	19,292

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL} – índices de retenção calculados ; RI_{LIT} – índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a $p < 0,05$.

Segundo Andujar-Ortiz *et al.*, (2006) as principais vantagens da LLE são a capacidade de extrair uma ampla gama de compostos de diferentes volatilidades (desde que tenham afinidade com o solvente), a alta repetibilidade e a possibilidade de realizar extrações simultâneas. Por sua vez, a alta seletividade da técnica SPME devido à disponibilidade comercial de muitas fases poliméricas, sua rapidez, simplicidade, o fato de ser isenta de solventes e a possibilidade de automatização de todo o processo de extração, faz com que a sua utilização tenha vindo a crescer.

Os álcoois são os principais compostos voláteis produzidos durante a FA do vinho, nas amostras analisadas o álcool isoamílico e o álcool feniletílico foram os compostos que apresentaram maior área de pico em relação a todos os álcoois identificados, conforme apresentado na Tabela 6 e Tabela 7. Em Jiang & Zhang (2010), o álcool isoamílico também foi o mais abundante, contribuindo com propriedades sensoriais do queijo para o aroma do vinho. O álcool feniletílico confere aroma de mel e rosas (Ruiz *et al.*, 2019). Outros álcoois foram detetados: isobutanol, hexanol, heptanol e álcool benzílico que são contribuintes importantes para o aroma do vinho e já foram descritos por Jiang & Zhang (2010).

Tabela 6 – Álcoois identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	RI _{CAL}	RI _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
4	Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	12,4356	n.c.	1092	0,735±0,078	0,610 ±0,346	0,482±0,323
7	Álcool isoamílico	C ₅ H ₁₂ O	16,5267	n.c.	1211	59,499 ^a ±2,236	56,524 ^b ±0,516	54,776 ^c ±1,426
14	4-metil-pentan-1-ol	C ₆ H ₁₄ O	20,1423	n.c.	1311	0,021±0,001	0,025±0,009	0,021±0,005
15	2-heptanol	C ₇ H ₁₆ O	20,2949	n.c.	1318	0,008±0,001	0,009±0,003	0,009±0,001
16	3-metil-pentan-1-ol	C ₆ H ₁₄ O	20,5824	n.c.	1334	0,091±0,005	0,110±0,037	0,096±0,003
19	Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	21,4473	n.c.	1359	0,622±0,038	0,729±0,259	0,673±0,024
20	Hex-3-enol (isómero 1)	C ₆ H ₁₂ O	21,8087	1301	1387	0,006±0,000	0,007±0,003	0,006±0,000
21	Hex-3-enol (isómero 2)	C ₆ H ₁₂ O	22,5160	1322	1387	0,011±0,001	0,012±0,004	0,012±0,001
23	Hex-2-enol (isomero)	C ₆ H ₁₂ O	23,1993	1343	1410	0,002 ^a ±0,001	0,003 ^a ±0,001	0,004 ^b ±0,000
24	2,4-dimetil-3-pentanol	C ₇ H ₁₆ O	23,9231	1365	n.e.	0,001 ^a ±0,000	0,002 ^b ±0,000	0,001 ^{ab} ±0,000
26	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	24,5760	1385	1448	0,007±0,001	0,008±0,003	1,943±5,803
27	Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	24,7930	1392	1461	0,116±0,032	0,109±0,047	0,115±0,008
30	2-etil-hexanol	C ₈ H ₁₈ O	25,8681	1427	1484	0,006 ^a ±0,001	0,015 ^b ±0,009	0,008 ^a ±0,002
34	2-nonanol	C ₉ H ₂₀ O	26,7786	1457	1514	0,003 ^a ±0,001	0,005 ^b ±0,002	0,005 ^b ±0,001
57	1-decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	33,8749	1703	1748	0,004±0,001	0,006±0,003	0,006±0,001
64	Álcool benzílico	C ₇ H ₈ O	37,0691	1825	1888	0,035±0,004	0,042±0,021	0,046±0,013
67	Álcool feniletílico	C ₈ H ₁₀ O	38,0345	1863	1922	3,824 ^a ±0,476	6,256 ^b ±3,142	5,560 ^{ab} ±1,569
68	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	39,2272	1911	1981	0,001±0,000	0,001±0,001	0,001±0,000
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						64,992	64,473	63,764

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL} – índices de retenção calculados ; RI_{LIT} – índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a $p < 0,05$.

Analisando a Tabela 6 e Tabela 7 verifica-se a existência de diferenças significativas nos compostos: álcool isoamílico, hex-2-enol (isomero), 2,4-dimetil-3-pentanol, 2-etil-hexanol, 2-nonanol, álcool feniletílico, 2,3-butanodiol, álcool benzílico e triptofol. Apesar dos álcoois não mudarem muito com o envelhecimento, é possível verificar alguns aumentos devido à hidrólise de ésteres ou evaporação durante o envelhecimento em madeira (Câmara *et al.*, (2006)). Neste estudo, verificou-se um ligeiro aumento no 2-nonanol, 2,3-butanodiol e triptofol com o envelhecimento em profundidade.

Tabela 7 – Álcoois identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Álcoois								
Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	RI _{CAL}	RI _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
2	Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	11,4154	n.c.	1092	3,928±1,462	3,379±0,874	3,480±0,748
4	Butanol	C ₄ H ₁₀ O	13,1708	n.c.	1175	0,161±0,060	0,136±0,037	0,142±0,031
5	Álcool isoamílico	C ₅ H ₁₂ O	15,4606	n.c.	1211	25,904 ^a ±12,307	41,060 ^{ab} ±17,518	29,699 ^b ±15,880
12	4-metil-pentan-1-ol	C ₆ H ₁₄ O	19,0193	n.c.	1311	0,008±0,005	0,005±0,002	0,008±0,006
14	3-metil-pentan-1-ol	C ₆ H ₁₄ O	19,4569	n.c.	1334	0,051±0,030	0,043±0,018	0,059±0,021
36	2,3-butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂	26,3197	1442	1541	0,040 ^a ±0,028	0,081 ^b ±0,028	0,099 ^b ±0,020
47	Álcool furfurílico	C ₅ H ₈ O ₂	29,8376	1560	1665	0,034±0,013	0,029±0,008	0,030±0,007
58	Álcool benzílico	C ₇ H ₈ O	35,8848	1779	1888	0,255 ^a ±0,087	0,171 ^b ±0,055	0,260 ^a ±0,060
61	Álcool feniletílico	C ₈ H ₁₀ O	36,9015	1818	1922	31,280±10,315	27,265±8,360	33,839±7,402
78	Triptofol	C ₁₀ H ₁₁ NO	47,2012	2260	n.e.	0,005 ^a ±0,001	0,010 ^b ±0,003	0,021 ^c ±0,007
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						61,666	72,179	67,637

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL}-índices de retenção calculados ; RI_{LIT} -índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a p<0,05.

Na tabela 8 e tabela 9 estão identificados os ácidos carboxílicos presentes nas amostras. Verificou-se que o ácido octanóico e o butanodioico foram os ácidos que apresentaram maior área. O ácido octanóico está associado a aromas de gordura e laticínios (Jiang & Zhang (2010)), este foi detetado por SPME e LLE, enquanto o ácido butanodioico apenas foi detetado por LLE.

Tabela 8 - Ácidos carboxílicos identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Ácidos Carboxílicos								
Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	RI _{CAL}	RI _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
8	Ácido octanóico	C ₈ H ₁₆ O ₂	17,3966	n.c.	1239	8,023±0,186	9,288±3,268	8,328±0,291
11	Ácido n-decanóico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	18,9152	n.c.	1276	0,002±0,001	0,003±0,001	0,036±0,101
25	Ácido n-decanóico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	24,1982	1374	1441	0,016±0,002	0,025±0,013	0,021±0,009
49	Ácido 3-metilbutanoico	C ₅ H ₁₀ O ₂	31,6308	1622	1685	0,009 ^a ±0,005	0,021 ^b ±0,010	0,011 ^{ab} ±0,001
50	Ácido 2-metilbutanoico	C ₅ H ₁₀ O ₂	31,7355	1625	1687	0,005±0,009	0,003±0,003	0,002±0,002
63	Ácido hexanóico	C ₆ H ₁₂ O ₂	36,5704	1805	1861	0,020 ^{ab} ±0,003	0,027 ^a ±0,012	0,016 ^b ±0,008
70	Ácido octanóico	C ₈ H ₁₆ O ₂	41,9413	2025	2070	0,016 ^a ±0,002	0,025 ^b ±0,013	0,021 ^{ab} ±0,009
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						8,091	9,392	8,435

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL}-índices de retenção calculados ; RI_{LIT} -índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a p<0,05.

O ácido acético também foi detetado através da LLE (Tabela 9), este ácido pode ser prejudicial para o aroma dos vinhos uma vez que confere aromas a vinagre, mas a acidez volátil foi inferior a 1,2 g/L em todas as amostras.

Tabela 9 – Ácidos carboxílicos identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Ácidos Carboxílicos								
Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	R _{CAL}	R _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
28	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	23,4649	1351	1452	0,453±0,200	0,432±0,119	0,433±0,083
41	Ácido butanóico	C ₄ H ₈ O ₂	27,3569	1476	1618	0,018±0,010	0,024±0,010	0,033±0,017
57	Ácido hexanóico	C ₆ H ₁₂ O ₂	35,2274	1754	1861	0,134 ^{ab} ±0,057	0,099 ^a ±0,048	0,157 ^b ±0,059
66	Ácido octanóico	C ₈ H ₁₆ O ₂	40,6418	1970	2070	0,103±0,102	0,078±0,051	0,176±0,127
79	Ácido butanodioico	C ₆ H ₁₀ O ₄	47,6226	2280	2395	9,031±3,461	8,990±2,525	10,416±2,004
94	Ácido homovanílico	C ₉ H ₁₀ O ₄	61,8847	2901	3099	0,004±0,002	0,003±0,001	0,003±0,001
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						9,743	9,626	11,218

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; R_{CAL} – índices de retenção calculados ; R_{LIT} – índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a p<0,05.

Outros compostos como aldeídos, acetais, acetatos, terpenóides e cetonas também estão presentes no vinho, embora contribuam para o aroma dos vinhos apresentam áreas cromatográficas reduzidas. Para a classe dos aldeídos foram detetados apenas o furfural e a vanilina, o que indica que os vinhos estiveram em contacto com madeira durante o seu processo de vinificação. A SPME não foi um método adequado para a extração de vanilina, o mesmo foi reportado por Andujar-Ortiz *et al.*, (2006).

Tabela 10 - Compostos voláteis identificados por HS-SPME-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Outras classes								
Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	R _{CAL}	R _{LIT}	Área Relativa do Pico (%)		
						VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
Aldeído								
29	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	25,0696	1401	1466	0,032 ^{ab} ±0,001	0,039 ^a ±0,013	0,027 ^b ±0,001
Acetais								
59	2-benzil-1,3-dioxolano	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	34,6590	1733	1785	0,006 ^a ±0,001	0,010 ^b ±0,004	0,009 ^b ±0,001
Acetato								
61	Acetato de 2-feniletilo	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	35,5002	1764	1825	0,030 ^a ±0,005	0,049 ^b ±0,020	0,044 ^b ±0,006
Terpenóides								
52	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	32,2132	1643	1692	0,001±0,000	0,012±0,022	0,001±0,000
Norisoprenóides								
56	1,1,6-trimetil-1,2-di-hidronaftaleno	C ₁₃ H ₁₆	33,7245	1697	1712	0,008 ^a ±0,001	0,007 ^{ab} ±0,003	0,006 ^b ±0,001
Compostos de Enxofre								
53	3-(metiltio)-1-propanol	C ₄ H ₁₀ OS	32,7619	1663	1702	0,040 ^a ±0,005	0,064 ^b ±0,033	0,055 ^{ab} ±0,017
Outros Compostos								
10	3-etil pentano	C ₇ H ₁₆	18,5015	n.c.	n.e.	0,042±0,001	0,045±0,017	0,038±0,003
12	2-(etoximetil) furano	C ₇ H ₁₀ O ₂	19,1769	n.c.	1291	0,144 ^{ab} ±0,004	0,164 ^a ±0,056	0,115 ^b ±0,042
32	2-acetil furano	C ₆ H ₆ O ₂	26,4542	1446	1491	0,002±0,000	0,004±0,002	0,004±0,002
42	Longifoleno 3	C ₁₅ H ₂₄	28,7930	1524	1583	0,058±0,059	0,107±0,111	0,496±1,207
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						0,417	0,501	0,795

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; R_{CAL} – índices de retenção calculados ; R_{LIT} – índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a p<0,05.

Por HS-SPME-GC/TOFMS identificou-se o 2-benzil-1,3-dioxolano pertencente à classe dos acetais, este composto possui descritor a floral (jasmim). Verificaram-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as amostras, evidenciando áreas ligeiramente superiores nos vinhos envelhecidos em profundidade.

Na classe dos acetatos apenas foi identificado o acetato de 2-feniletilo. Este composto tem descritor a aroma floral, por SPME observou-se um ligeiro aumento no envelhecimento em profundidade em relação ao vinho que estagiou em cave, contudo por LLE não se verificaram diferenças estatísticas entre amostras.

O norisóprenoide 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidronaftaleno (TDN) também foi encontrado em todas as amostras, este confere odores desagradáveis a querosene e gasolina, afetando negativamente a qualidade de um vinho se presente em concentrações elevadas.

Tabela 11 - Compostos voláteis identificados por LLE-GC/TOFMS para os diferentes estágios VT, VP1 e VP2.

Nº do Pico	Composto	Fórmula Química	Tempo de Retenção (min)	Outras classes		Área Relativa do Pico (%)		
				RI _{CAL}	RI _{LIT}	VT	VP1	VP2
						$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
Aldeído								
30	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	23,8691	1364	1466	0,045±0,016	0,042±0,016	0,043±0,012
82	Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	51,5460	2472	2538	0,014 ^a ±0,010	0,006 ^b ±0,002	0,009 ^{ab} ±0,003
Acetato								
56	Acetato de 2-feniletilo	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	34,3002	1719	1825	0,025±0,016	0,019±0,009	0,029±0,017
Cetona								
19	1-pentanona-4- metil-fenil	C ₁₂ H ₁₆ O	20,8611	n.c.	n.e.	0,002±0,001	0,002±0,000	0,002±0,001
Lactona								
44	Butirolactona	C ₄ H ₆ O ₂	29,1281	1536	1643	0,982±0,325	0,858±0,238	0,984±0,193
Compostos de Enxofre								
49	3-(metiltio)-1-propanol	C ₄ H ₁₀ OS	31,5830	1620	1702	0,430±0,163	0,387±0,100	0,394±0,090
Outros Compostos								
9	N,N,O-triacetil hidroxilamina	C ₆ H ₉ NO ₄	17,3436	n.c.	n.e.	0,004 ^a ±0,001	0,003 ^{ab} ±0,001	0,002 ^b ±0,001
26	1,2,4,5-tetrametil benzeno	C ₁₀ H ₁₄	23,0972	1340	1438	0,003±0,001	0,003±0,001	0,003±0,001
96	Tirosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	62,5524	n.c.	3012	0,488 ^a ±0,196	0,390 ^{ab} ±0,107	0,341 ^b ±0,117
Subtotal (Área Relativa do Pico(%))						1,993	1,710	2,242

Legenda: n.c. – não calculado; n.e. – não encontrado na literatura; RI_{CAL}-índices de retenção calculados ; RI_{LIT} -índices de retenção relatados na literatura; \bar{X} – média de nove valores; DP – desvio padrão; médias designadas com letras diferentes na linha mostram a existência de diferenças significativas entre amostras a $p < 0,05$.

Através da aplicação da LLE, foi identificada uma cetona, a 1-pentanona-4-metil-fenil e uma lactona, a butirolactona. Estes compostos apresentaram áreas cromatográficas percentuais relativamente pequenas e não se verificaram diferenças estatísticas entre as amostras. O único composto de enxofre identificado foi o 3-(metiltio)-1-propanol, este confere odores a batata cura, alho e vegetais cozidos (Tao *et al.*, (2008)).

Na Figura 25 é apresentado o subtotal em % de área relativa de todos os compostos voláteis semi-quantificados por famílias, pode-se verificar que os álcoois são uma das principais classes de compostos, seguidos dos ésteres e dos ácidos carboxílicos, respetivamente.

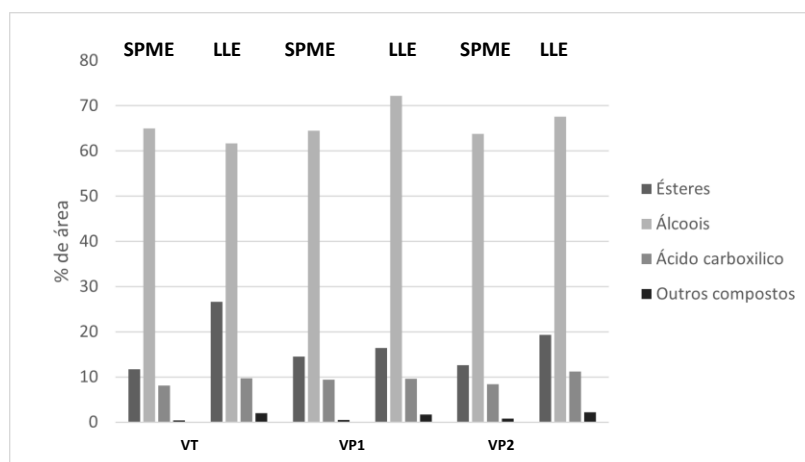


Figura 25 – Principais classes de compostos identificados nos vinhos e respetivas técnicas de extração.

Neste estudo, podemos verificar que os diferentes envelhecimentos: VT, VP1 e VP2, provocaram alterações no perfil de compostos voláteis apesar das alterações serem ténues. Contudo, observa-se um ligeiro aumento da área relativa dos ésteres nas amostras envelhecidas em profundidade, comparando com as amostras que envelheceram em cave, recorrendo à técnica de extração SPME. Com a LLE, verifica-se o oposto, ocorre uma diminuição do teor em ésteres nos vinhos que envelheceram em profundidade. Nos álcoois, recorrendo à técnica de SPME, observa-se uma redução destes compostos no envelhecimento em profundidade, enquanto na LLE verifica-se um aumento destes compostos.

Em relação aos ácidos carboxílicos, recorrendo à SPME verifica-se um aumento destes compostos no envelhecimento em profundidade, por sua vez, na LLE verifica-se uma diminuição dos ácidos carboxílicos em VP1, e um aumento em VP2, em relação ao VT. Por fim, na identificação de outros compostos verifica-se um aumento de área recorrendo à SPME nas amostras envelhecidas em profundidade face às amostras que estagiaram em cave. Recorrendo a LLE, a evolução foi idêntica aos ácidos carboxílicos, verifica-se uma diminuição dos ácidos em VP1 e um aumento em VP2, face a VT.

Não foi encontrado nenhum trabalho sobre o impacto do envelhecimento em profundidade nos vinhos, contudo, as alterações na composição química e, conseqüentemente, na análise sensorial durante o envelhecimento do vinho em profundidade, estão relacionados com a temperatura, luminosidade, pressão, movimentação e o tempo que as garrafas estão em envelhecimento, como referido anteriormente.

4.4. Análise Canónica Discriminante

Com os valores obtidos por SPME para os compostos voláteis, e apenas com os que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no teste ANOVA, foi efetuada uma análise canónica discriminante utilizando o programa IBM SPSS Statistics 25, com o objetivo de avaliar a relação entre os compostos voláteis e o tipo de envelhecimento, os resultados são apresentados na Figura 26.

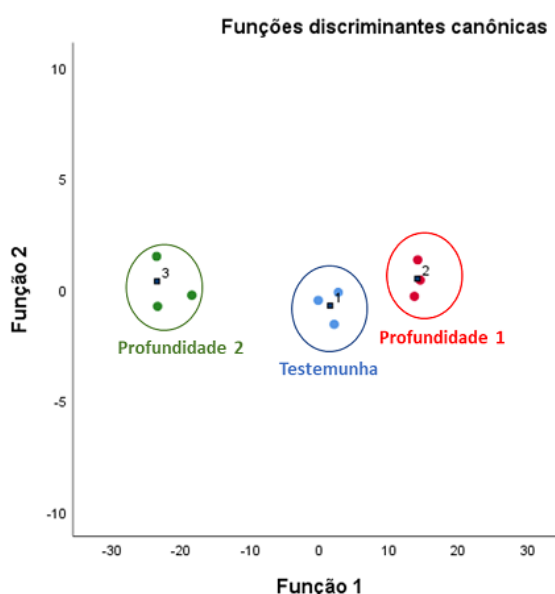


Figura 26 – Análise Canónica Discriminante

As duas funções obtidas explicam 100% da variabilidade entre as amostras, com a primeira função a contribuir com 99,8% e a segunda função a contribuir apenas com 0,2% da variância. Os valores de Lambda de Wilks são de 0,002 ($p=0,044$) e 0,661 ($p=0,871$) com valores de correlação canónica de 0,999 e 0,582, respetivamente. Os valores de Lambda de Wilks que são utilizados para avaliar estatisticamente a significância das funções discriminantes, variam entre 1 (funções sem poder discriminante) e 0 (elevado poder discriminante) (Cabrita *et al.*, (2021)). Assim, com os valores por nós encontrados apenas a primeira função tem poder discriminante.

A Figura 26, permite de uma forma muito visual verificar que efetivamente as amostras se encontram bem discriminadas.

Capítulo 5 | Conclusões

5.1. Considerações Finais

Foi realizado um estudo sobre o envelhecimento de vinhos em profundidade no mar. A partir da literatura infere-se que a informação sobre os vinhos envelhecidos em profundidade não só é escassa como limitada.

Contudo, a análise sumária permitiu conhecer os vinhos em estudo, todos os parâmetros encontram-se dentro dos limites legais exigidos pelo IVV. Não se verificaram diferenças estatísticas entre amostras com exceção do sulfuroso total que apresentou teores superiores no vinho envelhecido em profundidade.

Relativamente à cor, a IC e a TC não sofreram qualquer alteração significativa com o envelhecimento em profundidade, verificou-se uma diminuição no teor em FT e FnA e um aumento do teor em IF, AL e AT. Estes resultados devem-se a conjunto de fatores, nomeadamente à técnica de vinificação e condições a que o vinho foi sujeito durante o envelhecimento. Anteriormente, o aumento do teor em antocianinas com o envelhecimento em profundidade foi relatado em Palacios *et al.*, (2014).

Na análise da composição volátil, a utilização de duas técnicas de extração HS-SPME e LLE acoplada a cromatografia gasosa com deteção de espectrometria de massa de tempo de voo (GC/TOFMS) permitiram identificar diversos compostos pertencentes a diferentes classes, como ésteres, álcoois, ácidos carboxílicos, aldeídos, acetais, acetatos, terpenóides, norisoprenóides, compostos de enxofre, entre outros compostos. As técnicas utilizadas parecem adequar-se à questão em estudo, não se verificaram problemas na extração nem na identificação dos compostos voláteis presentes nas três modalidades (VT, VP1 e VP2). Concluiu-se também que, diferentes técnicas de extração podem conduzir a resultados dispares.

Os compostos voláteis identificados e semi-quantificados estão de acordo com os encontrados em outros vinhos *Cabernet Sauvignon*. No entanto, foram identificados alguns compostos nomeadamente: 3-hidroxi butanoato de etilo, 2-hidroxi-4-metil pentanoato de etilo, etil butil succinato, 3-metil-1-butil-butanedionao de etilo, 2-nonanol, 2-benzil-1,3-dioxolano, acetato de 2-feniletilo, 2,3-butanodiol e triptofol que demonstram efetivamente ter sofrido alteração com o envelhecimento em profundidade.

Apesar de não se verificar uma clara correlação entre o vinho envelhecido em cave e em profundidade em termos de evolução dos compostos, a análise estatística revelou que as amostras se encontram bem discriminadas.

Por fim, revela-se essencial a recolha de mais dados para demonstrar que efetivamente o envelhecimento em profundidade altera as características dos vinhos, deverão ser realizados mais estudos semelhantes e os resultados comparados antes de se poder chegar a uma conclusão definitiva.

5.2. Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho foi condicionada por diversos fatores, nomeadamente na aquisição das amostras. Não foi possível obter um número de amostras significativo, com diferentes tempos de estágio, várias profundidades e diferentes tipos de vinho.

Numa perspetiva de continuação deste trabalho, sugere-se a utilização de diversas amostras com diferentes tempos de estágio, bem como diferentes profundidades para se obter dados mais representativos. Conhecer as características do vinho ao longo do tempo permitirá reduzir o número de variáveis que variam de amostra para amostra e o único fator responsável pelas alterações será a profundidade.

Será também interessante realizar uma análise sensorial, com o intuito de verificar se existem diferenças sensoriais, e se de facto o envelhecimento em profundidade origina vinhos diferenciados pelos provadores.

Bibliografia

- Azevedo, J., Jesus, M., Brandão, E., Soares, S., Oliveira, J., Lopes, P., Mateus, N., & de Freitas, V. (2022). Interaction between salivary proteins and cork phenolic compounds able to migrate to wine model solutions. *Food Chemistry*, 367, 130607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130607>
- Andujar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Pozo-Bayón, M. A. (2009). Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 73517357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.055>
- Bakker, J., Bridle, P. & Timberlake, C. (1986). "Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour." *Vitis*, Vol. 25, 67-78. <https://doi.org/10.5073/vitis.1986.25.67-78>
- Cabrita, M.J.; Pires, A.; Burke, A.J.; Garcia, R. Seeking a Fast Screening Method of the Varietal Origin of Olive Oil: The Usefulness of an NMR-Based Approach. *Foods* 2021, 10, 399. <https://doi.org/10.3390/foods10020399>
- Cabrita, M. J., Ricardo-da-Silva, J., & Laureano, O. (2003). Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos. I Seminario Internacional de Vitivinicultura; Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa INIFAP.
- Câmara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>
- Canuti, V., Conversano, M., Calzi, M. L., Heymann, H., Matthews, M. A., & Ebeler, S. E. (2009). Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 30123022. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.104>
- Cardeira R., "Factores Críticos de Sucesso no Mercado do Vinho em Portugal e a Sustentabilidade do Sector Vitivinícola", IST , 2009.
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R. A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020a). Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods*, 10(1), 51. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
- Carpena, M., Pereira, A., Prieto, M. and Simal-Gandara, J., (2020b). Wine Ageing Technology: Fundamental Role of Wood Barrels. *Foods*, 9(9), p.1160. <https://doi.org/10.3390/foods9091160>
- Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2018). Wine evolution during bottle ageing, studied by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International*. [doi:10.1016/j.foodres.2018.08.075](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.075)

- Castro, R., Natera, R., Benitez, P., & Barroso, C. G. (2004). Comparative analysis of volatile compounds of 'fino' sherry wine by rotatory and continuous liquid–liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 141150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.002>
- Castro, R., Natera, R., Durán, E., & García-Barroso, C. (2008). Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology*, 228(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0900-4>
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*, 11(12), 914–920. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.179>
- Crouvisier-Urión, K., Bellat, J.-P., Gougeon, R. D. & Karbowiak, T. Gas transfer through wine closures: a critical review. *Trends Food Sci. Technol.* 78, 255–269 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.021>
- De Freitas, V., Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N. and Mateus, N., 2017. A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1). <https://doi.org/10.20870/oenone.2017.51.1.1604>
- del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., & Merino, S. (2008). Ageing markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.014>
- Di Stefano, R.; Cravero, M. C.; Gentilini, N. (1989) – *Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini*. L'enotecnico, (5) 83-89.
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. and Simal-Gandara, J., 2021. Bottle Ageing and Storage of Wines: A Review. *Molecules*, 26(3), p.713. <https://doi.org/10.3390/molecules26030713>
- Esparza, I., Santamaría, C., Calvo, I., & Fernández, J. M. (2009). Significance of CIELAB parameters in the routine analysis of red wines Relevancia de los parámetros CIELAB en el análisis de rutina de vinos tintos. *CyTA - Journal of Food*, 7(3), 189–199. <https://doi.org/10.1080/19476330903068001>
- Furtado, I., Lopes, P., Oliveira, A. S., Amaro, F., Bastos, M. d. L., Cabral, M., Guedes de Pinho, P., & Pinto, J. (2021). The Impact of Different Closures on the Flavor Composition of Wines during Bottle Ageing. *Foods*, 10 (9), 2070. <https://doi.org/10.3390/foods10092070>
- Gambetta, J. M., Bastian, S. E. P., Cozzolino, D., & Jeffery, D. W. (2014). Factors Influencing the Aroma Composition of Chardonnay Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6512–6534. <https://doi.org/10.1021/jf501945s>

- García Martín, J. F., & Sun, D.-W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.005>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 18441858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2^a partie: mesure, origine et interpretation. *Connaissance Vigne Vin* 18 (4): 253-271. <https://doi.org/10.20870/oenone.1984.18.4.1744>
- G. Pereira, A., Fraga, M., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jimenez-Lopez, C., Lourenço-Lopes, C., Barros, L., C.F.R. Ferreira, I., Angel Prieto, M., & Simal-Gandara, J. (2021). Management of Wine Aroma Compounds: Principal Basis and Future Perspectives. In *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Ageing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92973>
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2007). *Wine Production: Vine To Bottle*. (K. Grainger & H. Tattersall, Eds.), Wine Production: Vine To Bottle. Oxford, UK: K. Grainger & H. Tattersall 2005.
- Gürbüz, O., Rouseff, J. M., & Rouseff, R. L. (2006). Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography–Olfactometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 3990–3996. <https://doi.org/10.1021/jf053278p>
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules*, 26(3), 718. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their ColorExpression. *Molecules*, 17(2),15711601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- Hernández, B.; Sáenz, C.; Alberdi, C.; Alfonso, S.; Diñeiro, J. M. (2010). Colour evolution of rosé wines after bottling. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(1), pp.42–50. <https://doi.org/10.21548/32-1-1365>
- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A., Melendezmartinez, A., & Heredia, F. (2008). Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid–liquid extractions to determine the volatile compounds of wine. *Talanta*, 76(4), 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.049>
- IVV - Instituto da Vinha e do Vinho, 2021. Obtido em abril de 2021, de www.ivv.gov.pt.
- Infovini – Disponível em <http://www.infovini.com/classic/pagina.pgh?codPagina=20&codEsquema=0#cronos#submenu> (Consultado em 15 de abril de 2021).

- Jackson, R. (2008). Wine Science. Wine Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373646-8.X5001-X>
- Jiang, B., & Zhang, Z. (2010). Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules*, 15(12), 9184–9196. <https://doi.org/10.3390/molecules15129184>
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.-L. & Glories, Y. Main routes of oxygen ingress through different closures into wine bottles. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5167–5170 (2007). <https://doi.org/10.1021/jf0706023>
- Lukić, K., Čurko, N., Tomašević, M., & Kovačević Ganić, K. (2020). Phenolic and Aroma Changes of Red and White Wines during Ageing Induced by High Hydrostatic Pressure. *Foods*, 9(8), 1034. <https://doi.org/10.3390/foods9081034>
- Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. and Garde-Cerdán, T., 2020. Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137, p.109712. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>
- Martins, N., Garcia, R., Mendes, D., Costa Freitas, A. M., da Silva, M. G., & Cabrita, M. J. (2018). An ancient winemaking technology: Exploring the volatile composition of amphora wines. *LWT*, 96, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.048>
- Martínez-Gil, A., del Alamo-Sanza, M., Sánchez-Gómez, R. and Nevares, I., (2018). Different Woods in Cooperage for Oenology: A Review. *Beverages*, 4(4), p.94. <https://doi.org/10.3390/beverages4040094>
- Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>
- Mercer, C. (2021). Underwater wine ageing: Why are wineries doing it? *Decanter*. Disponível em: <<https://www.decanter.com/learn/underwater-wine-ageing-why-are-wineries-doing-it-456221/>> (Consultado em 8 de novembro de 2021).
- Milheiro, J., Vilamarim, R., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F., & Nunes, F. M. (2021). An accurate single-step LLE method using keeper solvent for quantification of trace amounts of sotolon in Port and white table wines by HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 350, 129268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129268>
- Monagas, M., Gomezcordoves, C., & Bartolome, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95 (3), 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.004>

- Nave, F., Cabrita, M. J., & da Costa, C. T. (2007). Use of solid-supported liquid–liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1169(1-2), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.067>
- Nunes, C., Santos, M. C., Saraiva, J. A., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2017). Influence of High Hydrostatic Pressure Technology on Wine Chemical and Sensorial Characteristics. *Advances in Food and Nutrition Research*, 205–235. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.01.003>
- OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho, 2021.
- OIV (2021). *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts*.
- Oliveira, J.M. 2000. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho, Tese de doutoramento, Universidade do Minho.
- Oliveira, V., Lopes, P., Cabral, M. & Pereira, H. Kinetics of oxygen ingress into wine bottles closed with natural cork stoppers of different qualities. *Am. J. Enol. Vitic.* **64**, 395–397 (2013). [doi:10.5344/ajev.2013.13009](https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13009)
- Paixão N, Perestrello R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 2007;105(1):204-214. [doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.017](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.017)
- Palacios, A., Ortuondo, J. e Saracho, B., (2014). Wines Treasured Under the Sea. Disponível em: <https://www.vilaviniteca.es/blog/en/wines-treasured-under-the-sea/> (Consultado em 31 de julho de 2021).
- Pereira, C., Mendes, D., Dias, T., Garcia, R., da Silva, M. and Cabrita, M., 2021. Revealing the yeast modulation potential on amino acid composition and volatile profile of Arinto white wines by a combined chromatographic-based approach. *Journal of Chromatography A*, 1641, p.461991. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461991>
- Pérez-Navarro, J., Izquierdo-Cañas, P., Mena-Morales, A., Chacón-Vozmediano, J., Martínez-Gascueña, J., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. and Gómez-Alonso, S., (2020). Comprehensive Chemical and Sensory Assessment of Wines Made from White Grapes of *Vitis vinifera* Cultivars Albillo Dorado and Montonera del Casar: A Comparative Study with Airén. *Foods*, 9(9), p.1282. <https://doi.org/10.3390/foods9091282>
- Petretto, G. L., Mercenaro, L., Urgeghe, P. P., Fadda, C., Valentoni, A., & Del Caro, A. (2021). Grape and Wine Composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cannonau Explored by GC-MS and Sensory Analysis. *Foods*, 10 (1), 101. <https://doi.org/10.3390/foods10010101>
- Piras, S., Brazão, J., Ricardo-da-Silva, J. M., Anjos, O., & Caldeira, I. (2020). Volatile and sensory characterization of white wines from three minority Portuguese grapevine varieties. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 35 (1), 49–62. <https://doi.org/10.1051/ctv/20203501049>

- Pittari, E., Moio, L., & Piombino, P. (2021). Interactions between Polyphenols and Volatile Compounds in Wine: A Literature Review on Physicochemical and Sensory Insights. *Applied Sciences*, 11(3), 1157. <https://doi.org/10.3390/app11031157>
- Plotkin, M. (2021). The Ethnobotany of Wine as Medicine in the Ancient Mediterranean World. *American Botanical Council*, 129, 56–71.
- Pomranz, M. (2021). Winery In Argentina Aged Its Wine Under the Sea. *Food & Wine*. Disponível em: <<https://www.foodandwine.com/news/wine-aged-under-ocean-argentina>> (Consultado em 8 de novembro de 2021)
- Prazeres, M., & Renema, W. (2018). Evolutionary significance of the microbial assemblages of large benthic Foraminifera. *Biological Reviews*, 94(3), 828–848. <https://doi.org/10.1111/brv.12482>
- Rapp A, Mandery H (1986). Wine aroma. *Experientia* 42:873-884
- Regulamento (CE) n.º 479/2008. *Jornal Oficial da União Europeia* de 29 de abril (Consultado em maio de 2021)
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology, Volume I – The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2nd ed., John Wiley & Sons: Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P.; Maujean, A.; Glories, Y. & Dubourdieu, D. (2006b). *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments In: Handbook of Enology - Vol.2*. England: John Wiley
- Rocha, S. M., Rodrigues, F., Coutinho, P., Delgadillo, I., & Coimbra, M.A. (2004). Volatile composition of Baga red wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.009>
- Rossetti, F., Jouin, A., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., Foligni, R., Longo, E., & Boselli, E. (2020). Impact of Different Stoppers on the Composition of Red and Rosé Lagrein, Schiava (Vernatsch) and Merlot Wines Stored in Bottle. *Molecules*, 25(18), 4276. <https://doi.org/10.3390/molecules25184276>
- Roubert, J. (1977). Détermination rapide du “nombre de couleurs” des vins rouges. *La France Viticole*, 9:pp.71- 73.
- Rubio-Bretón, P., Garde-Cerdán, T., & Martínez, J. (2018). Use of Oak Fragments during the Ageing of Red Wines. Effect on the Phenolic, Aromatic, and Sensory Composition of Wines as a Function of the Contact Time with the Wood. *Beverages*, 4(4), 102. <https://doi.org/10.3390/beverages4040102>
- Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascués, E., Calderón, F., Benito, A., Rauhut, D., Santos, A., & Benito, S. (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (18), 7425–7450. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10008-9>

- Singleton, V. e Rossi, J. (1965) Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticultura*, 16, 144-158.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>
- Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vin rouges. *Annales Technologie Agricole*, 7, 67-73.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., & Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), 18711-18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>
- Tao, Y., García, J. and Sun, D., 2013. Advances in Wine Ageing Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Ageing Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), pp.817-835 <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.609949>
- Tao, Y., Li, H., Wang, H., & Zhang, L. (2008). Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.05.007>
- Ugliano, M. (2013). Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Ageing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6125–6136. <https://doi.org/10.1021/jf400810v>
- van Wyk, S.; Hong, L.; Silva, F.V.M. Non-Thermal High Pressure Processing, Pulsed Electric Fields and Ultrasound Preservation of Five Different Table Wines. *Beverages* 2021, 7, 69. <https://doi.org/10.3390/beverages7040069>
- Vázquez-Pateiro, I., Arias-González, U., Mirás-Avalos, J. M., & Falqué, E. (2020). Evolution of the Aroma of Treixadura Wines during Bottle Ageing. *Foods*, 9(10), 1419. <https://doi.org/10.3390/foods9101419>
- Vilanova, M., Diago, M. P., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., & Tardaguila, J. (2011). Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 935–942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4673>
- Yıldırı, H. and Dündar, E., 2017. New techniques for wine ageing. *BIO Web of Conferences*, 9, p.02012. <https://10.1051/bioconf/20170902012>
- Kassam, A. (2021). Fancy a deep red? The rise of underwater wineries. *The Guardian*. <https://www.theguardian.com/environment/2021/mar/29/wineries-bottles-seabed-ageing> (Consultado em 8 de novembro de 2021)
- Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria*, 35(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-16202008000200001>

ANEXOS

I – Análise sumária dos vinhos envelhecidos em cave, profundidade 1 e 2 (VT, VP1 e VP2), respetivamente.

Código da Amostra	Garrafa	Teor Álcool Adquirido (% vol.)	Acidez Total (g(Ácido Tartárico)/L)	Acidez Volátil (g(Ácido Acético)/L)	pH	SO ₂ livre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)
VT	1	14,0	4,75	0,51	3,90	16	57
VT	2	14,0	4,71	0,48	3,87	14	58
VT	3	14,0	4,70	0,48	3,88	14	64
VP1	1	14,0	4,71	0,48	3,89	18	70
VP1	2	14,0	4,70	0,54	3,88	17	65
VP1	3	14,0	4,64	0,51	3,88	17	69
VP2	1	14,0	4,78	0,51	3,87	16	65
VP2	2	14,0	4,83	0,48	3,88	16	66
VP2	3	14,0	4,65	0,51	3,87	14	65

II – Resultados dos parâmetros IC, TC, IF, AL, FT, FnA e AT para VT, VP1 e VP2, respetivamente.

Código da Amostra	Garrafa	IC	TC	IF	AL	FT	FnA	AT
VT	1	1,10	0,89	45,95	43,36	5776,35	5482,95	331,50
VT	2	1,12	0,89	44,30	43,23	6392,76	6099,95	330,84
VT	3	1,12	0,90	44,15	46,42	6189,20	5894,62	332,83
VP1	1	1,09	0,88	46,95	48,94	5326,31	5016,72	349,79
VP1	2	1,12	0,88	46,70	50,14	5853,68	5549,98	343,14
VP1	3	1,11	0,89	45,10	48,01	5716,42	5418,90	336,16
VP2	1	1,12	0,87	45,50	51,21	5256,71	4948,89	347,80
VP2	2	1,13	0,87	45,90	48,81	5637,16	5334,34	342,14
VP2	3	1,12	0,87	43,95	52,00	5730,40	5422,87	347,46