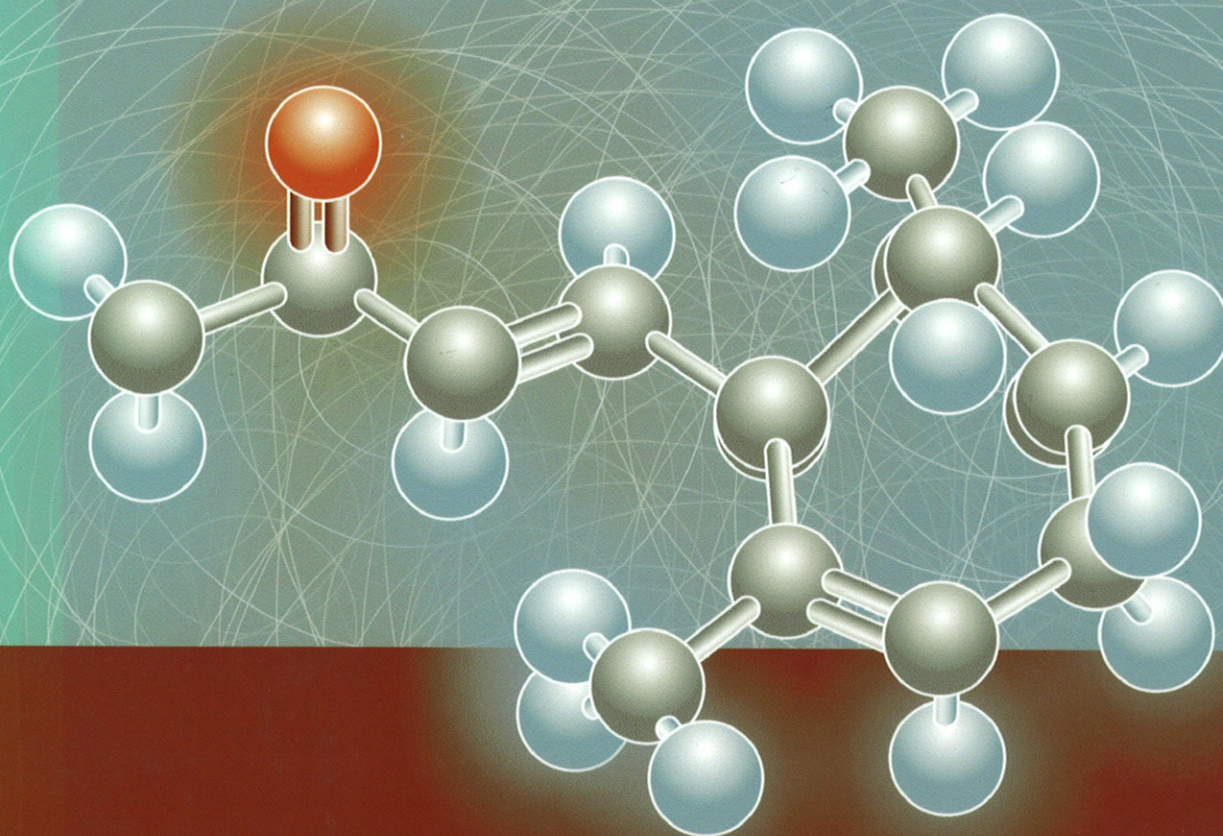


CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA DE CASTAS PRODUTORAS DE VINHO MADEIRA

DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA

BOAL, MALVAZIA, SERCIAL E VERDELHO



José de Sousa Câmara

UNIVERSIDADE DA MADEIRA 2004

54
CÂM cam
+c
T19



CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA DE CASTAS PRODUTORAS DE VINHO MADEIRA

BOAL, MALVAZIA, SERCIAL E VERDELHO

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
SECTOR DE DOCUMENTAÇÃO
E ARQUIVO

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em
Química Analítica e Tecnológica pela Universidade da
Madeira, nos termos do decreto lei nº 216/92 de 13 de Outubro

Orientação: Prof. Doutora Maria Arminda Costa Alves
Prof. Doutor José Carlos Antunes Marques

José de Sousa Câmara

Funchal, 2004

Aos meus Pais

À Cristina e ao Pedro Afonso ...

*A Sabedoria
está na simplicidade humanista
de quem vive a Ciência*

(Anônimo)

Prefácio

A caracterização aromática de algumas castas produtoras de vinho Madeira – *Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho*, contribuirá de forma inegável, para um melhor conhecimento científico dos nossos vinhos, investigação há muito desejada pelo Instituto do Vinho da Madeira (IVM).

Durante cerca de 24 anos - Julho de 1979 a Janeiro de 2003, nos quais tive o privilégio de exercer o cargo de Presidente da Direcção do Instituto do Vinho da Madeira, fomos confrontados com a necessidade de novas exigências e desafios que contribuíram decisivamente para alterações profundas no sector vitivinícola com reflexos muito positivos na melhoria da qualidade do vinho e rejuvenescimento do sector.

Para além de todas as transformações e melhoramentos no quadro técnico e logístico – criação do laboratório e sua posterior acreditação, câmara de provas, controle de existências nas empresas, promoção dos mercados externos em especial Inglaterra, França, Alemanha, Bélgica, EUA e Japão e interdição, em 2002, da exportação dos vinhos a granel, o IVM enfrentou três grande desafios que considero marcantes para o vinho da Madeira:

- proibição da utilização de mostos provenientes de híbridos americanos *jacquet, cunningham, hermont* e outros;
- proibição da comercialização de vinhos com o nome das castas nobres, Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho, provenientes de outras castas, em especial a Negra Mole e a interdição da utilização de caldas de açúcar;
- obtenção de um conhecimento científico sobre a caracterização aromática das castas utilizadas para o vinho Madeira;

O primeiro desafio surgiu antes da adesão de Portugal à CEE, logo no primeiro ano do IVM. Vencido este desafio, alterámos profundamente toda a filosofia anterior

de fabrico do vinho da Madeira, assumindo-se uma nova dinâmica para a reconversão da vinha.

O segundo desafio surgiu após a adesão da CEE, o que motivou uma concertação com as empresas para esta profunda alteração. Vencido este, ficou salvaguardada em legislação comunitária a utilização de mosto concentrado rectificado de uva bem como algumas especificidades para os nossos vinhos, tais como a graduação mínima natural de 9° para os mostos e não 12°, utilização da estufagem como método enológico tradicional para o envelhecimento.

Quanto ao terceiro, a Universidade da Madeira e o IVM através da tese de doutoramento do Dr. José Sousa Câmara, vencem este desafio.

O IVM sempre procurou salvaguardar no País e no estrangeiro a Denominação de Origem para o vinho da Madeira subscrevendo os acordos de Lisboa e fazendo o registo internacional da marca em Inglaterra, Alemanha, Espanha, Bélgica, EUA e outros. Mas era imperioso ter um suporte científico credível, que identificasse os nossos vinhos e os salvaguardasse de fraudes.

Não posso deixar de referir o bom relacionamento institucional sempre havido com a Universidade da Madeira, em especial através do Prof. Doutor José Carlos Marques, então Presidente do Departamento de Química, ao qual manifestei o desejo de vir a concretizar-se como objectivo primordial um trabalho desta natureza.

A partir dos resultados de investigação agora apresentados e referentes Às vindimas de 1998, 1999 e 2000, ficam os organismos oficiais e as empresas dotadas de um instrumento valioso para a defesa da Denominação de Origem, identificação dos vinhos e seu envelhecimento.

Para a história de Região Autónoma da Madeira este trabalho ficará como a primeira grande referência científica do Vinho Madeira para sua “Honra e Glória”.

Funchal, 2004



Constantino Lopes Palma

Agradecimentos

A concretização deste trabalho deve-se à contribuição de várias pessoas, a quem quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

À Prof. Doutora Maria Arminda C. Alves quero expressar o meu mais sincero agradecimento por todo o empenho e sabedoria oferecida, quer na orientação do trabalho experimental, quer na interpretação e organização dos resultados obtidos. Agradeço as calorosas recepções nas diversas idas à FEUP fazendo-me sentir em “casa”.

Ao Prof. Doutor José Carlos A. Marques, desejo manifestar um profundo reconhecimento pela forma como sempre me soube inculcar o gosto pelo “vinho”. Pelo estímulo, pela amizade, pela disponibilidade, pelos ensinamentos. Muito obrigado.

Ao Doutor Constantino Palma, *Ex-Presidente do Instituto do Vinho da Madeira*, dinamizador e impulsionador deste projecto, desejo manifestar o meu agradecimento pelo apoio, pela disponibilidade e pelo empenho.

Ao Prof. Doutor António César S. Ferreira, um especial agradecimento pelas “grandes lições”, pela motivação, pelo empenho que dedicou nomeadamente no estudo da evolução dos compostos aromáticos ao longo do envelhecimento. Agradeço a preciosa colaboração e ajuda.

Ao Prof. Doutor Paulo Herbert, novo amigo de sempre, agradeço o grande exemplo, os ensinamentos, e a preciosa ajuda na interpretação dos resultados estatísticos. Obrigado Herbert.

À Eng^a Isabel Spranger desejo manifestar um profundo reconhecimento pelo incondicional apoio desde a primeira hora, pela disponibilidade demonstrada e pela paciência com que combateu o meu pessimismo nalgumas fases do trabalho.

Ao Eng. Francisco Albuquerque agradeço as informações fornecidas sobre o processo de elaboração do vinho Madeira.

À Prof. Doutora Helena Caldeira Araújo, à Prof. Doutora Isabel Torres e à Doutora Helena Figueira da Silva, quero agradecer o companheirismo, a amizade, a ajuda e o estímulo.

Ao Eng^o João Brazão agradeço a preciosa ajuda prestada na amostragem das uvas.

À Dr.^a. Mónica Fernandes, da Análise Estatística Madeira L^{da}., pela preciosa colaboração na análise multivariável.

Ao António Freitas agradeço a colaboração laboratorial prestada numa fase do trabalho.

A todos os meus colegas do Departamento de Química, agradeço todo o apoio manifestado ao longo do trabalho. A curiosidade e interesse de alguns permitiu conversas agradáveis. Os meus agradecimentos são extensíveis a todos aqueles que tiveram uma sobrecarga de trabalho originada pela minha dispensa de serviço Docente.

Aos funcionários do Departamento de Química, agradeço toda a ajuda, amabilidade e simpatia sempre presentes.

À Universidade da Madeira, nomeadamente ao Magnífico Reitor, desejo agradecer todo o apoio que me foi dado traduzido, fundamentalmente, na dispensa de serviço Docente, indispensável para a realização dum trabalho desta natureza.

Um projecto com estas características necessita de verbas, por isso quero agradecer ao Centro de Química da Madeira – CQM e ao Centro de Investigação e Tecnologia da Madeira – CITMA, todo o apoio financeiro concedido para deslocações a congressos Nacionais e Internacionais. Ao PRODEP desejo manifestar o meu agradecimento pela concepção da Bolsa N^o 4/5.3/PRODEP/2000.

Por fim, quero agradecer carinhosamente a todos os que me são mais próximos.

À Cristina agradeço tudo aquilo que as palavras são incapazes de descrever. A compreensão, a paciência, o incentivo e as palavras de encorajamento foram fundamentais para a prossecução deste trabalho em todos os momentos mas, especialmente, nos menos bons.

Obrigado, Pai (onde quer que estejas) e Mãe, pela educação que me foi dada e pela oportunidade de ingressar no curso de Química. Agradeço todos os esforços e privações subjacentes à minha licenciatura.

Aos meus Sogros, D^a. Maria José Ornelas e Sr. Manuel C. Ornelas, desejo agradecer toda a ajuda, apoio, motivação e incentivo, ao longo destes anos.

Aos meus irmãos, em especial a minha irmã Marta e ao cunhado João Baptista, estou grato pelo apoio e estímulo que sempre demonstraram.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que de uma ou de outra forma me apoiaram e incentivaram. O vosso apoio foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigado.

RESUMO

Os objectivos fundamentais do presente trabalho foram a caracterização química de quatro castas nobres utilizadas na produção de vinho Madeira: *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, e a discriminação das castas estudadas a partir dos parâmetros analisados. Estudámos ainda o comportamento de alguns grupos de compostos químicos ao longo do envelhecimento dos vinhos.

Pelo facto dos conhecimentos sobre a composição aromática dos vinhos Madeira e das castas que os originam serem escassos, iniciou-se este estudo de forma sistemática com as quatro castas referenciadas. Foi efectuado um varrimento exaustivo do potencial aromático livre presente nas uvas, nos mostos e nos vinhos correspondentes. De modo a consolidar os resultados, as quatro castas foram estudadas durante três vindimas 1998, 1999 e 2000. Este facto permitiu tirar algumas conclusões sobre a influência do ano de vindima nos diferentes grupos de compostos aromáticos.

O grupo de amostras estudadas compreendeu as uvas das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, do ano de 2000, 39 mostos das vindimas de 1998, 1999 e 2000, e os 39 vinhos monovariais correspondentes com 8 meses de cada uma das castas estudadas, nos três anos considerados.

Numa fase complementar, foram igualmente objecto de estudo 86 vinhos das diferentes castas com idades diferenciadas (entre os 8 meses os 25 anos), por forma a avaliar o comportamento evolutivo de alguns compostos ao longo do envelhecimento.

A análise da fracção aromática livre das uvas, mostos e vinhos, foi precedida do desenvolvimento de um método analítico (*microextração em fase sólida com espaço de cabeça*, *HS-SPME*) para extração, separação e identificação simultânea do maior número de compostos voláteis possível, e quantificação de alguns deles.

Verificou-se que os teores totais de monoterpenóis e norisoprenóides encontrados nos mostos e nos vinhos monovarietais das diferentes castas estudadas, são relativamente baixos, o que as permite classificar como não aromáticas.

Verificou-se que as concentrações dos terpenóis não sofreram grandes alterações nos três anos estudados.

Concluiu-se que é possível distinguir os mostos das castas *Boal* e *Verdelho* através da razão das áreas relativas do acetato de 2-feniletilo/ β -damascenona. A razão dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol, pode ser utilizada para diferenciar os mostos das castas *Malvazia* e *Verdelho* dos mostos das castas *Boal* e *Sercial*. Os vinhos das quatro castas podem ser distinguidos através da razão das áreas relativas dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol.

Os teores determinados para a 4-hidroxi-3,4-dimetil-2(3H)-furanona (sotolon) nas diferentes variedades estudadas, permite concluir que este composto, tem uma contribuição importante para as notas aromáticas, essencialmente a “especiarias” e a “noz”, que se desenvolvem ao longo do envelhecimento dos vinhos Madeira.

Ao conjunto de dados obtidos foram aplicados métodos de análise multivariável, que englobaram a análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante (LDA), permitindo deste modo estudar as principais fontes de variabilidade presentes no conjunto de dados, e estabelecer relações entre as amostras (objectos) e os compostos (variáveis).

ABSTRACT

The primary purposes of the present work were the chemical characterisation of the four noble varieties used in the production of Madeira wines: *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* and *Verdelho*, and from the analysed parameters discriminating the varieties under investigation. The behaviour of some groups of chemical compounds during wine aging was also evaluated.

The fewer knowledge about the aromatic composition of Madeira wines and the varieties from which they are made, we begin our work from a systematic mode. Thus, an exhaustive scanning of the free aromatic potential present in grape, musts and corresponding wines was made. So as to consolidate the results obtained, the four varieties were studied over three consecutive vintages (1998 to 2000). This fact allows make some conclusions about the influence of the year of harvest in the total aromatic free fraction of each variety.

The group of samples studied included the grapes of *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* and *Verdelho* from harvest of 2000, 39 musts of some varieties from 1998 to 2000 harvests, and the corresponding 39 monovarietal wines with 8 month of age.

Subsequently, 86 wine samples from *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* and *Verdelho* varieties with ages between 8 month and 25 years, were object of study, so as to evaluate the evolution of some compounds during wine aging.

The analysis of aromatic free fraction of grapes, musts and wines, was preceded by development of the analytical methodology (headspace solid phase microextraction, HS-SPME) for extraction, isolation and simultaneous identification the great number of volatile compounds and quantification of some of them.

We remark that the total content of monoterpenols and C₁₃ norisoprenoids founded in musts and corresponding monovarietal wines, are relatively low, permitting

to classify these varieties as *non-aromatics*. Was also observed that the terpenol contents are, practically, constants over the three vintages studied.

The results allow us confirm that is possible differentiate the musts of *Boal* and *Verdelho* varieties through of relative content ratio of *2-phenylethylacetate*/ β -*damascenone*. The relative ratio of (*E*) and (*Z*) isomers of hex-3-en-1-ol can be used to differentiate the *Malvazia* and *Verdelho* musts from *Boal* and *Sercial*.

The wines from four varieties can be differentiated through the relative content ratio of (*E*) and (*Z*) isomers of hex-3-en-1-ol.

The levels of 4-hydroxy-3,4-dimethyl-2(3H)-furanone (sotolon) founded in Madeira wines under study, and the *flavour* handed by these compound, with a limiar of olfactive perception (LPO) of 20 $\mu\text{g/L}$ in fortified wines (Silva Ferreira, 1998), allow us conclude that the sotolon was an important contribution for the aromatic character that develops during Madeira wines aging.

Multivariate methods, principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA), were applied to the obtained data set, allows to study the main sources of variability present in the data, and to establish relations between samples (objects) and compounds (variables).

ÍNDICE

Prefácio	<i>i</i>
Agradecimentos	<i>iii</i>
Resumo	<i>vi</i>
Abstract	<i>viii</i>
Índice	<i>x</i>
Lista de figuras	<i>xv</i>
Lista de tabelas	<i>xxii</i>
Lista de quadros	<i>xxv</i>
Lista de siglas e abreviaturas	<i>xxvi</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO E OBJECTIVOS	1
1.2 APRESENTAÇÃO GERAL DO VINHO MADEIRA	3
1.2.1 Historial do vinho Madeira	3
1.2.2 Castas recomendadas para a produção de vinho Madeira	5
1.2.2.1 Boal	6
1.2.2.2 Malvazia	7
1.2.2.3 Sercial	8
1.2.2.4 Verdelho	8
1.2.3 Factores naturais	9
1.2.4 Aspectos fitotécnicos	10
1.2.5 Produção	10
1.2.6 Tecnologia de vinificação	12
1.2.7 Controlo e certificação	15
1.2.8 Papel do envelhecimento na composição química	16
1.2.9 Características organolépticas	17
1.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS DAS UVAS E DOS VINHOS	18
1.3.1 Classificação e origem	19

1.3.2	Aromas primários ou varietais	20
1.3.2.1	Monoterpenóis	21
1.3.2.1.1	Principais constituintes de origem terpénica	26
1.3.2.2	Norisoprenóides em C ₁₃	27
1.3.2.3	Metoxipirazinas	31
1.3.2.4	Tióis voláteis	33
1.3.3	Aromas pré-fermentativos	34
1.3.4	Aromas fermentativos	36
1.3.4.1	Álcoois superiores	38
1.3.4.2	Ácidos gordos voláteis	41
1.3.4.3	Ésteres etílicos	45
1.3.4.4	Compostos carbonilados	49
1.3.4.4.1	Lactonas	51
1.3.4.5	Compostos azotados	53
1.3.4.6	Compostos sulfurados	55
1.3.4.7	Fenóis voláteis	58
1.3.5	Aromas terciários ou “bouquet”	61
1.4	FRACÇÃO LIVRE E LIGADA DA COMPONENTE AROMÁTICA	61
1.5	EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS AO LONGO DO ENVELHECIMENTO	64
1.5.1	Compostos monoterpénicos e norisoprenóides em C ₁₃	65
1.5.2	Ésteres e álcoois superiores	68
1.5.3	Compostos carbonilados	69
1.5.3.1	Lactonas	70
1.5.3.2	Aldeídos furânicos	73
1.5.4	Outros compostos	74
1.6	INFLUÊNCIA DAS OPERAÇÕES TECNOLÓGICAS NO AROMA DO VINHO	77
1.7	ANÁLISE MULTIVARIÁVEL APLICADA À CARACTERIZAÇÃO DE MOSTOS E VINHOS	78
1.7.1	Conceitos gerais	78
1.7.2	Aplicação à análise de mostos e vinhos	81
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1	METODOLOGIA GLOBAL	86
2.2	A MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA NA ANÁLISE DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DO VINHO	87

2.3	AMOSTRAS EM ESTUDO	90
2.4	CARACTERÍSTICAS DAS VINHAS	92
2.5	REAGENTES E CONSUMÍVEIS	92
2.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	93
2.6.1	Método analítico para a quantificação de monoterpenóis e outros compostos voláteis	93
2.6.1.1	Preparação dos padrões e amostras	93
2.6.1.2	Procedimento SPME	94
2.6.1.3	Condições cromatográficas	95
2.6.1.4	Identificação e quantificação dos compostos	96
2.6.2	Método analítico para o estudo do perfil aromático das uvas, mostos e vinhos	96
2.6.2.1	Preparação das amostras	96
2.6.2.2	Procedimento SPME	97
2.6.3	Métodos analíticos para o estudo dos compostos voláteis ao longo do envelhecimento	97
2.6.3.1	Preparação das amostras	98
2.7	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	98
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1	OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE	99
3.1.1	Seleção do tipo de fibra	100
3.1.2	Efeito da temperatura de extracção	101
3.1.3	Efeito do tempo de extracção	102
3.1.4	Temperatura e tempo de dessorção	103
3.1.5	Efeito da força iónica	103
3.1.6	Efeito do pH	105
3.1.7	Efeito do teor de etanol	106
3.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	107
3.2.1	Precisão	108
3.2.2	Exactidão.....	109
3.2.3	Linearidade e limites de detecção	110
3.2.4	Quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos e nos vinhos monovarietais	111
3.2.4.1	Teores de monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos	113
3.2.4.2	Teores de monoterpenóis e norisoprenóides nos vinhos monovarietais ..	118

3.3	CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DAS UVAS DAS CASTAS BOAL, MALVAZIA, SERCIAL E VERDELHO	124
3.4	CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DOS MOSTOS DAS CASTAS BOAL, MALVAZIA, SERCIAL E VERDELHO	130
3.5	CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DOS VINHOS DAS CASTAS BOAL, MALVAZIA, SERCIAL E VERDELHO	145
3.5.1	Monoterpenóis e norisoprenóides em C ₁₃	151
3.5.2	Álcoois superiores	152
3.5.3	Ácidos gordos voláteis	158
3.5.4	Ésteres	161
3.5.4.1	Acetatos de álcoois superiores	161
3.5.4.2	Ésteres etílicos de ácidos gordos	163
3.5.4.3	Ésteres etílicos de ácidos fixos	167
3.6	AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO AROMÁTICA DE ALGUNS COMPOSTOS NOS VINHOS DAS CASTAS ESTUDADAS	171
3.7	COMPARAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS LIVRES NAS UVAS, MOSTOS E VINHOS ..	174
3.8	ESTUDO DA FRACÇÃO LIVRE NO DECURSO DO ENVELHECIMENTO POR HS-SPME	176
3.9	ESTUDO DA FRACÇÃO LIVRE NO DECURSO DO ENVELHECIMENTO POR EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	182
3.9.1	Ésteres	184
3.9.1.1	Acetatos de álcoois superiores	185
3.9.1.2	Ésteres etílicos de ácidos gordos	187
3.9.1.3	Ésteres etílicos de ácidos fixos	189
3.9.2	Fenóis voláteis	193
3.9.3	Compostos carbonilados	193
3.9.3.1	Etanal e benzaldeído	194
3.9.3.2	Acetais	195
3.9.3.3	Lactonas furânicas e pirânicas	199
	i) γ -butanolactona	200
	ii) <i>cis</i> - e <i>trans</i> -3-metiloctano-4-lactona	200
	iii) 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona	201
	iv) 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona	203
3.9.3.4	Aldeídos furânicos: furfural, 5-metilfurfural e 5-(hidroximetil)furfural	204
3.9.4	Sotolon	207
3.9.4.1	Identificação	207
3.9.4.2	Quantificação	209
3.10	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO: HS-SPME vs DCM	211

3.11	ANÁLISE MULTIVARIÁVEL APLICADA AOS MOSTOS E AOS VINHOS MONOVARIETAIS ..	212
3.11.1	PCA aplicada aos resultados dos terpenóis nos mostos	213
3.11.2	LDA aplicada aos resultados dos terpenóis nos mostos	218
3.11.3	PCA aplicada aos resultados dos terpenóis nos vinhos monovarietais	220
3.11.4	LDA aplicada aos resultados dos terpenóis nos vinhos monovarietais	223
3.12	ANÁLISE DE MULTIVARIÁVEL APLICADA AOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS VINHOS MONOVARIETAIS	225
3.12.1	PCA aplicada aos álcoois superiores	226
3.12.2	PCA aplicada aos ácidos gordos voláteis	228
3.12.3	PCA aplicada aos ésteres etílicos de ácidos gordos e ácidos fixos	231
3.12.4	PCA aplicada aos compostos carbonilados	233
3.12.5	LDA aplicada aos compostos voláteis dos vinhos monovarietais	235
4.	CONCLUSÕES	238
	PERSPECTIVAS FUTURAS	245
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	246
	ANEXOS	
	Anexo A	271
	Anexo B	288

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1	Principais países consumidores de vinho Madeira	5
Figura 1.2	Cacho de uvas representativo da variedade Boal	7
Figura 1.3	Cacho de uvas representativo da variedade Malvazia	7
Figura 1.4	Cacho de uvas representativo da variedade Sercial	8
Figura 1.5	Cacho de uvas representativo da variedade Verdelho	8
Figura 1.6	Locais de cultivo, de maior importância, das castas nobres	11
Figura 1.7	Evolução da produção do vinho Madeira nos últimos oito anos	12
Figura 1.8	Processos de elaboração e envelhecimento do vinho Madeira	15
Figura 1.9	Distribuição das substâncias voláteis nas diferentes partes do bago	18
Figura 1.10	Sequência biotecnológica da produção de vinho e sua relação com os diferentes tipos de aroma	20
Figura 1.11	Potencial aromático da uva	21
Figura 1.12	Biossíntese dos terpenóides nas plantas	23
Figura 1.13	Estrutura dos principais álcoois monoterpênicos encontrados nos vinhos	26
Figura 1.14	Possível mecanismo de formação da β -damascenona a partir da neoxantina	29
Figura 1.15	Evolução dos norisoprenóides em C_{15}	30
Figura 1.16	Possível mecanismo de formação da 2-metoxi-3-isobutilpirazina a partir da leucina	31
Figura 1.17	Formação por via enzimática dos aldeídos e dos álcoois em C_6 a partir dos precursores da uva	34
Figura 1.18	Formação de compostos aromáticos pelas leveduras a partir dos açúcares, aminoácidos e enxofre	36
Figura 1.19	Biossíntese dos álcoois superiores a partir dos aminoácidos de acordo com o mecanismo de Ehrlich	38
Figura 1.20	Mecanismo de formação do propan-1-ol a partir dos ácidos pirúvico e acético	39
Figura 1.21	Formação de alguns ácidos orgânicos constituintes do vinho, a partir do ácido pirúvico ...	44
Figura 1.22	Mecanismo de biossíntese dos ácidos gordos	46
Figura 1.23	Síntese do diacetilo a partir do α -cetolactato	50
Figura 1.24	Possível via de formação da γ -butirolactona	52
Figura 1.25	Mecanismo de formação do metionol a partir da metionina	58

Figura 1.26	Mecanismo biossintético de formação dos vinilfenóis a partir dos ácidos cinâmicos	59
Figura 1.27	Mecanismo enzimático da produção de etilfenóis pela <i>Bretanomyces</i>	60
Figura 1.28	Diferentes formas de glicósidos e algumas agliconas encontrados na uva. Mecanismo de hidrólise enzimática dos precursores.....	62
Figura 1.29	Principais transformações sofridas pelo vinho durante o envelhecimento em cascos de madeira	64
Figura 1.30	Algumas modificações moleculares dos terpenóis em meio ácido	66
Figura 1.31	Estruturas químicas e síntese dos óxidos do linalol	67
Figura 1.32	Formação do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon) a partir do ácido α -cetobutírico	72
Figura 1.33	Mecanismo proposto para a formação do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon) de acordo com a reacção de Maillard	72
Figura 1.34	Possível mecanismo de formação e degradação do 5-(hidroximetil)furfural a partir da D-glucose	73
Figura 1.35	Possível mecanismo de formação do 5-(etoximetil)furfural a partir do 5-(hidroximetil)furfural	74
Figura 1.36	Mecanismo de formação das acetamidas no decurso do envelhecimento do vinho	75

Capítulo 2

Figura 2.1	Representação esquemática da microextração em fase sólida com espaço de cabeça	88
-------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 3

Figura 3.1	Comparação da eficiência de extração dos monoterpenóis e norisoprenóides em solução aquosa por HS-SPME usando diferentes fibras. O volume de amostra foi de 2,4 ml com 30 % de NaCl, o tempo de extração de 60 min. e a temperatura de extração de 40 °C	100
Figura 3.2	Efeito da temperatura na eficiência da extração dos monoterpenóis e norisoprenóides em solução aquosa por HS-SPME com fibra de poliacrilato (PA-85 μ m). O tempo de extração foi de 60 min. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno)	101
Figura 3.3	Perfis da cinética de absorção para os compostos estudados por HS-SPME utilizando uma fibra de PA-85 μ m, A – solução aquosa, B – solução etanólica a 18 %. A temperatura de absorção foi de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno)	102
Figura 3.4	Efeito da força iónica na eficiência de extração dos compostos estudados por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85 μ m, numa solução etanólica a 18 %. O tempo de extração foi de 120 minutos à temperatura de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno)	104

Figura 3.5	Efeito do pH na eficiência de extração dos monoterpênicos e norisoprenóides em solução etanólica a 18 % por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85µm. O tempo de extração foi de 120 min. e a temperatura de 40 °C. (Ac/A _{pi} – área do composto/área do padrão interno)	105
Figura 3.6	Efeito da concentração de etanol na eficiência de extração dos compostos estudados por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85µm. O tempo de extração foi de 120 min. e a temperatura de absorção de 40 °C. (Ac/A _{pi} – área do composto/área do padrão interno)	106
Figura 3.7	Curvas de calibração resultantes da extração por HS-SPME de alguns dos compostos estudados em solução aquosa (sol. aq.) e em solução etanólica a 18 % (EtOH 18 %) (Ac/A _{pi} – área do composto/área do padrão interno)	110
Figura 3.8	Extractos de cromatogramas SIM (iões de <i>m/z</i> =93+121+136) de uma amostra de mosto Verdelho -A e do vinho monovarietal correspondente -B, da vindima de 2000, obtido de acordo com as condições dos quadros I e II; (R _I : índice de retenção)	112
Figura 3.9	Teores totais dos terpenóides (Terp) e norisoprenóides (Nor. C13) determinados para os mostos das diferentes castas estudadas (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho)	115
Figura 3.10	Teores médios (n=36) dos monoterpênicos e norisoprenóides individuais determinados para os mostos das diferentes castas, relativos às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho)	116
Figura 3.11	Influência do ano de vindima nos teores de monoterpênicos e norisoprenóides para os mostos da casta Malvazia	117
Figura 3.12	Total de terpenóides livres, por ano de vindima, nos mostos das castas estudadas (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho)	118
Figura 3.13	Teor total de monoterpênicos (Terp) e norisoprenóides (Nor. C13) nos vinhos das diferentes castas estudadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho)	120
Figura 3.14	Teores médios (média±desvio padrão) dos compostos varietais presentes nos 36 vinhos das diferentes castas estudadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho)	121
Figura 3.15	Influência do ano de vindima no teor de monoterpênicos e norisoprenóides, exemplificada para os vinhos da casta Malvazia	122
Figura 3.16	Perfil do total de terpenóides nos vinhos monovariais em cada uma das castas, nas três vindimas estudadas	123
Figura 3.17	Composição média dos bagos nas diferentes castas estudadas	124
Figura 3.18	Cromatograma GC-MS dos compostos voláteis da fracção livre de uma amostra de uvas Boal da vindima de 2000, resultante da extração por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se descrita na tabela 3.5	125
Figura 3.19	Percentagem de cada grupo de compostos aromáticos da fracção livre das uvas (exceptuando o (-)-limoneno), expressa em termos de área relativa, nas diferentes castas estudadas, relativamente ao total de cada casta (Ter – monoterpênicos; Alc. Terp. – álcoois terpenóicos; Nor. C13 – norisoprenóides em C ₁₃ ; Ald/Cet – aldeídos /cetonas)	127

Figura 3.20	Cromatograma GC-MS de uma amostra de mosto Verdelho da vindima de 2000, resultante da extracção por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo com as condições dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se na tabela 3.6 ...	131
Figura 3.21	Total da fracção livre aromática nos mostos das diferentes castas estudadas	134
Figura 3.22	Percentagens (exceptuando o hexan-1-ol) dos diferentes grupos de compostos da fracção livre do aroma dos mostos das diferentes castas estudadas, referentes à vindima de 1999, expressas em termos de áreas relativas	134
Figura 3.23	Cromatograma SIM ($m/z=56+67+81$) de alguns álcoois superiores de uma amostra de mosto Boal da vindima de 2000	135
Figura 3.24	Teores médios (média \pm desvio padrão) do hexan-1-ol e do 2-feniletanol, nos mostos das diferentes castas estudadas	137
Figura 3.25	Cromatograma SIM ($m/z=60+73+87$) dos ácidos gordos voláteis de uma amostra de mosto da casta Boal da vindima de 2000	138
Figura 3.26	Comparação, em termos de áreas relativas, da distribuição da fracção livre total de cada grupo de compostos aromáticos, nos mostos das diferentes castas estudadas. Valores médios obtidos para as três vindimas (1998, 1999 e 2000)	141
Figura 3.27	Variacção da fracção livre aromática total dos mostos das diferentes castas, nas três vindimas efectuadas	142
Figura 3.28	Extractos de cromatogramas (SIM; $m/z=67+81$) de diferentes mostos evidenciando as diferenças existentes entre o <i>acetato de 2-feniletilo</i> e a β - <i>damascenona -A</i> ; e entre os isómeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) do hex-3-en-1-ol - <i>B</i>	144
Figura 3.29	Cromatograma GC-MS de uma amostra de vinho Malvazia da vindima de 2000, resultante da extracção por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo com as condições dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se na tabela 3.12 .	146
Figura 3.30	Percentagem dos diferentes grupos de compostos aromáticos da fracção livre do aroma dos vinhos das diferentes castas, referentes à vindima de 1999	149
Figura 3.31	Comparação, em termos de áreas relativas, da distribuição da fracção livre total de cada grupo de compostos aromáticos, nos mostos das diferentes castas estudadas. Valores médios obtidos para as três vindimas	150
Figura 3.32	Total da fracção livre aromática nos vinhos das diferentes castas estudadas	151
Figura 3.33	Variacção da percentagem relativa dos norisoprenóides (Nor C13) e monoterpenóis (Terp) referente às três vindimas, para as diferentes castas estudadas	152
Figura 3.34	Cromatograma SIM ($m/z=56+67+81$) de alguns álcoois superiores de uma amostra de vinho Malvazia da vindima de 2000	153
Figura 3.35	Teores médios de alguns álcoois superiores presentes nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas	155
Figura 3.36	Variacção da percentagem relativa dos álcoois superiores nas três vindimas, para cada casta estudada	156
Figura 3.37	Extracto de um cromatograma (SIM: $m/z=67+81$) de um vinho Boal e Malvazia com a identificação dos picos correspondentes ao (<i>E</i>)-hex-3-en-1-ol e ao (<i>Z</i>)-hex-3-en-1-ol	157
Figura 3.38	Cromatograma SIM ($m/z=60+87+101$) dos ácidos gordos voláteis de uma amostra de vinho Malvazia da vindima de 2000	158

Figura 3.39	Teores médios (média±desvio padrão) dos ácidos hexanóico e octanóico presentes nas quatro variedades de vinhos Madeira estudadas	160
Figura 3.40	Variação da percentagem relativa dos ácidos gordos voláteis nas diferentes castas produtoras de vinho Madeira para as três vindimas estudadas.....	161
Figura 3.41	Teores médios (média±desvio padrão) dos acetatos de álcoois superiores identificados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas	162
Figura 3.42	Variação da percentagem relativa dos acetatos de álcoois superiores, dos ésteres de ácidos gordos e de ácidos fixos para cada vindima efectuada, nas diferentes variedades de vinho Madeira	163
Figura 3.43	Cromatograma SIM (m/z=88+101+157) dos ésteres etílicos de ácidos gordos de uma amostra vinho Malvazia da vindima de 2000	164
Figura 3.44	Teores médios (média±desvio padrão) dos ésteres etílicos de ácidos gordos quantificados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas	166
Figura 3.45	Variação da percentagem relativa dos compostos carbonilados (Ald/Cet) nas diferentes castas de vinho Madeira, para cada vindimas estudada	169
Figura 3.46	Variação da percentagem relativa dos compostos furânicos e dos fenóis voláteis nas diferentes castas, para cada vindima	170
Figura 3.47	Variação da fracção livre aromática total nas diferentes castas estudadas, para cada ano de vindima	171
Figura 3.48	Distribuição de alguns dos compostos que contribuem para o perfil aromático dos vinhos Madeira	173
Figura 3.49	Estruturas químicas dos compostos odorificamente activos dos vinhos das castas Boal (B), Malvazia (M), Sercial (S) e Verdelho (V)	174
Figura 3.50	Evolução dos diferentes compostos aromáticos da fracção livre das uvas, (excepto o (-)-limoneno), dos mostos (excepto o hexan-1-ol) e dos vinhos (exceptuando o 2-metilbutan-1-ol, o 2-feniletanol e o decanoato de etilo) ao longo do processo de elaboração do vinho, para a casta Sercial (US-uvas Sercial, MS- mosto Sercial, VS-vinho Sercial)	175
Figura 3.51	Cromatogramas GC-MS resultantes da extracção por HS-SPME de duas amostras de vinhos da casta Malvazia, com 8 meses e 25 anos, respectivamente	177
Figura 3.52	Correlação entre os teores de vitispirano I e vitispirano II para os vinhos Madeira estudados	178
Figura 3.53	Evolução de álcoois superiores ao longo do envelhecimento para vinhos da casta Boal com 8 meses (2000), 11 (1990) e 25 anos (1976) de envelhecimento	179
Figura 3.54	Evolução dos teores de ácidos gordos ao longo do envelhecimento para os vinhos da casta Boal com 8 meses (2000), 11 (1990) e 25 anos (1976)	180
Figura 3.55	Evolução da fracção livre aromática total dos vinhos das diferentes castas estudadas ao longo do envelhecimento (extracção: HS-SPME, fibra PA-85µm)	181
Figura 3.56	Cromatogramas GC-MS resultantes da extracção com DCM de duas amostras de vinhos da casta Verdelho, com 8 meses e 25 anos, respectivamente	183
Figura 3.57	Evolução dos teores de álcoois superiores ao longo do envelhecimento dos vinhos Madeira (extracção líquido-líquido com diclorometano)	184

Figura 3.58	Evolução dos teores de acetato de isoamilo verificada nos vinhos da casta Boal (n=26) ao longo do envelhecimento	186
Figura 3.59	Perfil da evolução dos teores de ésteres etílicos de ácidos gordos no decurso do envelhecimento para os vinhos das diferentes castas estudadas	187
Figura 3.60	Evolução dos teores de octanoato de etilo durante o envelhecimento, para vinhos da casta Boal (n=26)	188
Figura 3.61	Evolução dos ésteres etílicos de ácidos fixos durante o envelhecimento	189
Figura 3.62	Correlação entre o SME (succinato de monoetilo) e o SDE (succinato de dietilo) durante o envelhecimento dos vinhos Madeira (n=86)	191
Figura 3.63	Evolução dos teores de malato de dietilo ao longo do envelhecimento para os 26 vinhos da casta Boal	192
Figura 3.64	Evolução dos teores dos fenóis voláteis, dos vinhos da variedade Boal, ao longo do envelhecimento	193
Figura 3.65	Evolução dos teores de benzaldeído com a idade para os vinhos da casta Boal (n=26)	194
Figura 3.66	Reacção de formação de um acetal	195
Figura 3.67	Cromatograma SIM de um extracto de DCM de uma amostra de vinho Verdelho de 1990 (acetais: iões de m/z=103 + 107; octan-3-ol: iões de m/z=83)	196
Figura 3.68	Percentagem relativa (expressa em termos do padrão interno), dos quatro acetais presentes nas diferentes castas de vinho Madeira estudadas	197
Figura 3.69	Evolução das proporções relativas das formas isoméricas dos 1,3-dioxanos e 1,3-dioxolanos ao longo do envelhecimento	197
Figura 3.70	Correlação entre as formas isoméricas dos acetais cíclicos do glicerol e do acetaldeído	198
Figura 3.71	Evolução dos teores totais dos acetais do glicerol e do acetaldeído com a idade para os diferentes vinhos (n=86) estudados	199
Figura 3.72	Espectro de massa do isómero cis-whisky lactona -A, e trans-whisky lactona -B; do extracto orgânico de um vinho	201
Figura 3.73	Possível via de formação da 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona	201
Figura 3.74	Evolução dos teores de 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona ao longo do envelhecimento dos vinhos Verdelho (n=21)	202
Figura 3.75	Espectro de massa da pantolactona do extracto orgânico de um vinho -A; e espectro de massa da pantolactona da biblioteca NIST92 -B	202
Figura 3.76	Formação da 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (DDMP) de acordo com a reacção de Maillard	203
Figura 3.77	Espectro de massa da 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (DDMP) do extracto orgânico de um vinho -A; espectro de massa da biblioteca NIST92 -B	203
Figura 3.78	Evolução dos aldeídos furânicos ao longo do envelhecimento nos 26 vinhos da casta Boal	205
Figura 3.79	Evolução do furfural com a idade (n=86)	206
Figura 3.80	Evolução do 5-(hidroximetil)furfural com a idade (n=86)	206
Figura 3.81	Espectros de massa do extracto orgânico de um vinho do 5-(acetoximetil)furfural -A; e do 5-(etoximetil)furfural -B	207
Figura 3.82	Correlação entre as áreas relativas do 5-(etoximetil)furfural e do 5-(hidroximetil)furfural	207

Figura 3.83	Espectro de massa do sotolon do extracto orgânico de um vinho - A ; e espectro de massa da biblioteca NIST92 - B	208
Figura 3.84	Evolução da concentração do sotolon com a idade, nos diferentes tipos de vinhos Madeira, (n=86)	210
Figura 3.85	Comparação da eficiência dos dois métodos utilizados na extracção dos diferentes grupos de compostos aromáticos	211
Figura 3.86	Projecção bidimensional da influência das 7 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total do sistema	216
Figura 3.87	Projecção bidimensional dos 36 mostos estudados identificados por casta, nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total da amostra	216
Figura 3.88	Projecção bidimensional dos 36 mostos estudados identificados por anos, nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total da amostra	217
Figura 3.89	Projecção bidimensional das duas primeiras funções discriminantes dos mostos, na qual se visualizam os objectos não classificados à priori	219
Figura 3.90	Projecção bidimensional da influência das 10 variáveis da matriz VinhosVarietais nos dois primeiros componentes principais, que representam 89,9 % da variância total do sistema	221
Figura 3.91	Projecção bidimensional dos 36 vinhos estudados identificados por casta, nos dois primeiros componentes principais. Representam 89,9 % da variância total do sistema	221
Figura 3.92	Projecção bidimensional dos 36 vinhos estudados identificados por ano de colheita, nos dois primeiros componentes principais, que representam 89,9 % da variância total da amostra	222
Figura 3.93	Projecção bidimensional das duas primeiras funções discriminantes dos vinhos na qual se visualizam os objectos não classificados à priori	224
Figura 3.94	Projecção bidimensional da influência das 9 variáveis nos primeiro e segundo componentes principais, que representam 87,9 % da variância total do sistema	228
Figura 3.95	Projecção bidimensional dos vinhos nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,9 % da variância total do sistema com 9 variáveis	228
Figura 3.96	Projecção tridimensional da influência das 6 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que explicam 85,8% da variância total do sistema	230
Figura 3.97	Projecção bidimensional dos 36 vinhos das diferentes castas estudados, nos planos definidos pelos dois primeiros componentes principais, representando 85,8 % da variância total do sistema	230
Figura 3.98	Projecção bidimensional da influência das 10 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,0 % da variância total	232
Figura 3.99	Projecção bidimensional dos 36 vinhos nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,0 % da variância total do sistema inicial	232
Figura 3.100	Projecção bidimensional da influência das 7 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,1 % da variância total	234
Figura 3.101	Projecção bidimensional dos vinhos monovarietais nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,1 % da variância total do sistema inicial	234
Figura 3.102	Representação gráfica das duas primeiras funções discriminantes para os quatro grupos de vinhos, considerando as variáveis mais representativas	236

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1	Teores dos monoterpenóis livres mais representativos em mostos de diferentes castas	24
Tabela 1.2	Limiares de percepção e descritores aromáticos de alguns dos álcoois e óxidos terpénicos mais importantes do aroma das uvas e dos vinhos	27
Tabela 1.3	Algumas características dos norisoprenóides em C ₁₃ mais comuns	28
Tabela 1.4	Principais pirazinas encontradas nas uvas e nos vinhos, limiares de percepção olfactivos (água) e descritores aromáticos correspondentes	32
Tabela 1.5	Limiares de percepção olfactivos e descritores aromáticos de alguns dos principais tióis voláteis	33
Tabela 1.6	Aminoácidos precursores dos principais álcoois superiores encontrados nos vinhos	40
Tabela 1.7	Limiares de diferença olfactiva e descritores aromáticos de alguns álcoois superiores do vinho e cerveja	41
Tabela 1.8	Teores, limiares de percepção olfactiva e descritores aromáticos de alguns ácidos presentes nos vinhos	43
Tabela 1.9	Teores de alguns ésteres presentes no vinho, respectivos limiares de percepção olfactiva e descritores aromáticos	48
Tabela 1.10	Limiares de percepção olfactiva e descritores aromáticos de alguns compostos sulfurados em diferentes matrizes	56

Capítulo 2

Tabela 2.1	Identificação dos objectos de estudo	90
Tabela 2.2	Características das vinhas Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho	92

Capítulo 3

Tabela 3.1	Parâmetros de validação da metodologia analítica para a extracção dos analitos estudados em solução aquosa (sol. aq.) e em solução etanólica a 18 % (v/v) (EtOH 18 %) por HS-SPME (fibra PA-85µm, 2,4 ml de amostra; t _{ext.} =60 e 120 min. para a solução aquosa e etanólica, respectivamente; T _{ext.} =40 °C; t _{dessorção} =6 min.; T _{dessorção} =260 °C)	108
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3.2	Comparação entre as percentagens de recuperação em mostos e vinhos fortificados com uma solução padrão dos compostos estudados, obtidas com as condições dos quadros I e II (fibra PA-85, 2,4 ml de amostra, $t_{\text{ext.}}=60$ e 120 min. para mostos e vinhos, respectivamente; $T_{\text{ext.}}=40$ °C; $t_{\text{dessorção}}=6$ min.; $T_{\text{dessorção}}=260$ °C)	109
Tabela 3.3	Concentrações médias ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos monoterpenóis e dos norisoprenóides em C_{13} nos mostos das diferentes castas, para as três vindimas efectuadas	113
Tabela 3.4	Concentrações médias ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos monoterpenóis e dos norisoprenóides nos vinhos das diferentes castas, para as três vindimas efectuadas	119
Tabela 3.5	Compostos identificados nas uvas das diferentes castas, extraídos por HS-SPME com fibra de poliacrilato	126
Tabela 3.6	Compostos identificados nos mostos das diferentes castas estudadas após extracção por HS-SPME de acordo com as condições dos quadros I e II	132
Tabela 3.7	Percentagens médias expressas em termos de áreas relativas, de cada grupo de compostos aromáticos (exceptuando o hexan-1-ol) da fracção livre dos mostos das diferentes castas estudadas, para as vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; Mosto Verdelho)	133
Tabela 3.8	Concentrações médias ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos álcoois superiores, obtidos para os mostos das diferentes castas, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB –Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV - Mosto Verdelho)	136
Tabela 3.9	Valores médios relativos (Ac/Api), obtidos para os ácidos gordos voláteis nos mostos das diferentes castas estudadas, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV - Mosto Verdelho)	139
Tabela 3.10	Valores dos quocientes entre o acetato de 2-feniletilo e a β -damascenona e entre os isómeros (<i>Z</i>) e (<i>E</i>) do hex-3-en-1-ol, para os mostos das castas Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho	143
Tabela 3.11	Valores mínimos, máximos e médios dos parâmetros da análise sumária, por castas	145
Tabela 3.12	Compostos voláteis identificados nos vinhos das diferentes castas estudadas, resultantes da extracção por HS-SPME com fibra de poliacrilato (PA-85 μm) de acordo com as condições dos quadros I e II	147
Tabela 3.13	Percentagens médias de cada grupo de compostos aromáticos da fracção livre dos vinhos das diferentes castas estudadas, referente às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho)	148
Tabela 3.14	Concentrações médias ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos álcoois superiores nos vinhos das diferentes castas para as três vindimas efectuadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho)	154
Tabela 3.15	Valores do quociente entre os isómeros (<i>Z</i>) e (<i>E</i>) do hex-3-en-1-ol para os vinhos das castas estudadas	157
Tabela 3.16	Valores médios das áreas relativas obtidos para os principais ácidos gordos voláteis identificados nos vinhos das diferentes castas	159
Tabela 3.17	Valores médios obtidos para os principais ésteres etílicos dos ácidos gordos	165
Tabela 3.18	Concentração média ($n=3$) de acetaldeído e benzaldeído nos vinhos das diferentes castas para as três vindimas efectuadas	168

Tabela 3.19	Limiares olfactivos, descritores aromáticos e índices aromáticos dos compostos quantificados que contribuem para o aroma dos vinhos das castas Boal (VB), Malvazia (VM), Sercial (VS) e Verdelho (VV)	172
Tabela 3.20	Valores médios das áreas relativas (Ac/A _{pi}) obtidos para os três acetatos de álcoois superiores nos vinhos estudados	185
Tabela 3.21	Evolução dos valores médios determinados para os principais ésteres etílicos dos ácidos fixos ao longo do envelhecimento do vinho	190
Tabela 3.22	Valores extremos das áreas relativas (expressas em função do octan-3-ol) das diferentes lactonas identificadas nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas	204
Tabela 3.23	Valores extremos (mínimo e máximo) e médios das áreas relativas dos compostos furânicos determinados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.	205
Tabela 3.24	Concentrações extremas (mínima e máxima) e médias de sotolon nos vinhos Madeira	209
Tabela 3.25	Identificação das variáveis utilizadas na análise multivariável dos dados analíticos (M – mostos, V – vinhos)	214
Tabela 3.26	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos com as 7 variáveis	215
Tabela 3.27	Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante à matriz MostosVarietais	218
Tabela 3.28	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos com as 10 variáveis e 36 objectos da matriz VinhosVarietais	220
Tabela 3.29	Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante à matriz VinhosVarietais	223
Tabela 3.30	Identificação das 42 variáveis utilizadas na análise multivariável aplicada aos compostos voláteis	226
Tabela 3.31	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos três primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos das diferentes castas com as 9 variáveis da MatrizÁlcooisSuperiores	227
Tabela 3.32	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos das castas estudadas com as 6 variáveis da MatrizÁcidosGordos.....	229
Tabela 3.33	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos monovarietais com as 10 variáveis da MatrizÉsteres	231
Tabela 3.34	Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos três primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos estudados com as 7 variáveis da MatrizCompostosCarbonilados	233
Tabela 3.35	Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante às 19 variáveis mais representativas dos vinhos Madeira estudados	235

Lista de Quadros

Capítulo 1

- Quadro I** Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos compostos aromáticos da fracção livre das uvas, dos mostos e dos vinhos Madeira 95

Capítulo 2

- Quadro II** Condições utilizadas na microextração em fase sólida com espaço de cabeça (HS-SPME) dos compostos aromáticos da fracção livre das uvas, mostos e vinhos Madeira 107

Lista de siglas e abreviaturas

–	média
\bar{x}	
$\mu\text{g.L}^{-1}$	micrograma por litro
Ác. gordos voláteis	ácidos gordos voláteis
Ac/Api	área relativa (razão entre a área do composto e a área do padrão interno)
Acetatos	acetatos de álcoois superiores
Alc. superiores	álcoois superiores
Alc. Terp.	álcoois terpénicos
Ald/Cet	aldeídos e cetonas – compostos carbonilados
ATP	adenosina trifosfato
Car/PDMS	fibra de carboxeno/polidimetilsiloxano
Conc.	concentração
DCM	diclorometano
DDMP	2,3-dihidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-pirano-4-ona
DMAPP	dimetilalilpirofosfato
DMS	sulfureto de dimetilo
DMSO	dimetilsulfóxido
DOC	Denominação de Origem Controlada
DRE	Direcção Regional de Estatística
EI	impacto electrónico
Ést. Ác. fixos	ésteres etílicos de ácidos fixos
Ést. ác. gordos	ésteres etílicos de ácidos gordos
EtOH 18 %	solução etanólica a 18 %
FPP	farnesilpirofosfato
GC-O	cromatografia gasosa-olfactometria
GGPP	geranilgeranilpirofosfato
GPP	geranilpirofosfato
GS-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
hL	hectolitros
HMF	5-(hidroximetil)furfural
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
HS-SPME	microextração em fase sólida com espaço de cabeça
I	índice aromático
IMP	3-isobutil-2-metoxipirazina
IPP	isopentilpirofosfato
IR	índice de retenção
IVM	Instituto do Vinho da Madeira
LDA	análise linear discriminante
LLE	extração líquido-líquido

LLME	microextração líquido-líquido
LPO	limiar de percepção olfactivo
m/z	razão massa/carga do ião
m/v	massa por volume
Máx	máximo
MB	mosto Boal
MBP	2-metoxi-3-sec-butilpirazina
mg.L ⁻¹	miligrama por litro
MIBP	2-metoxi-3-isopropilpirazina
Mín	mínimo
min.	minutos
MIPP	2-metoxi-3-isopropilpirazina
MM	mosto Malvazia
MS	mosto Sercial
MV	mosto Verdelho
MVA	ácido mevalónico
MWC	Madeira Wine Company
n	número de medidas
ng.L ⁻¹	nanograma por litro
Nor C13	norisoprenóides em C ₁₃
OAV	valor de actividade olfactiva
OIV	Office International de la Vigne et Vin
PA-85	fibra de poliacrilato com 85 µm
pág.	página
PCA	análise de componente principal
PDMS	fibra de polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
RAM	Região Autónoma da Madeira
rpm	rotações por minuto
RSD	desvio padrão relativo
SIM	selecção de iões monotorizados
SO ₂	dióxido de enxofre
Sol. aq.	solução aquosa
SPME	microextração em fase sólida
TA	teor alcoólico
t _{dessorção}	tempo de dessorção
T _{dessorção}	temperatura de dessorção
TDN	1,1,6-trimetil-1,2-di-hidronaftaleno
Terp	monoterpenóis
t _{ext.}	tempo de extração
Text.	temperatura de extração
t _r	tempo de retenção
UB	uvas Boal
UCP	Universidade Católica Portuguesa
UM	uvas Malvazia
US	uvas Sercial

us	ultrasons
UV	uvas Verdelho
VB	vinho Boal
VLQPRD	Vinho Licoroso de Qualidade Produzido em Região Demarcada
VM	vinho Malvazia
vol.	volume
VS	vinho Sercial
v/v	volume por volume
VV	vinho Verdelho

Capítulo

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO E OBJECTIVOS

Descoberta em 1418 por João Gonçalves Zarco e Tristão Vaz Teixeira, e situada em pleno Oceano Atlântico, a Ilha da Madeira com uma área de 728 Km² (58 Km E-W e 23 Km N-S) tem uma população de cerca de 245.000 habitantes (Fonte: INE – Censos 2001). Dista aproximadamente 600 Km da costa oeste de Marrocos e 978 Km da costa sudoeste de Lisboa.

Desde meados dos Séc. XVI, que a Ilha da Madeira produz um dos vinhos mais famosos, conhecidos e comercializados mundialmente, vulgarmente designado por “*Vinho Madeira*”, um vinho licoroso com um teor alcoólico entre os 17 e 22 % (vol.), comercialmente disponível em diferentes tipos (meio seco, seco, meio doce e doce), consoante o conteúdo em açúcares. Define-se, não só pela qualidade das castas de que é resultante, mas também pelo peculiar processo de tratamento e vinificação destacando-se, a adição de álcool vínico para a interrupção da fermentação e o processo de envelhecimento prematuro do vinho por *estufagem*, que decorre durante cerca de três meses a uma temperatura de, aproximadamente, 50 °C.

Possui características ímpares no mundo vinícola pelo que se afigura importante preservar a sua genuinidade e tipicidade. Para tal torna-se necessário estudar pormenorizadamente a sua constituição química, as potencialidades das suas castas e as técnicas usadas na sua elaboração, visando alcançar por um lado, um melhor conhecimento do seu comportamento face aos processos tecnológicos a adoptar e, por outro, a melhoria da sua qualidade.

Entre as diferentes variedades cultivadas na Região Demarcada da Madeira, as castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, distinguem-se pela sua superior qualidade, estando perfeitamente adaptadas ao solo arenoso que caracteriza a região, assim como às condições climáticas.

Apesar das características ímpares e da importância económica dos vinhos Madeira para a região, não têm sido efectuados estudos científicos sistemáticos no que respeita à sua caracterização aromática assim como das variedades de uvas que lhe estão associadas.

Assim, considerando este facto e satisfazendo o desejo manifestado pelo Instituto do Vinho da Madeira (IVM), desenvolveu-se este trabalho com o objectivo primordial de estudar a composição aromática das quatro principais castas nobres que lhe dão origem – *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*. Para tal estudaram-se os compostos constituintes do aroma varietal, identificaram-se os compostos voláteis nomeadamente os formados durante o processo fermentativo resultantes da actividade microbiana, bem como os que têm a sua génese e evolução durante a conservação/envelhecimento, resultantes, quer de reacções redox quer dos sucessivos processos de acabamento a que o vinho é submetido. Alguns deste últimos podem considerar-se como marcadores da idade.

O estudo efectuado articulou-se em três partes:

- Numa primeira fase, foi nosso objectivo caracterizar a fracção livre aromática dos mostos e dos vinhos correspondentes das quatro castas nobres utilizadas na produção do vinho Madeira. Para tal, estudou-se o perfil aromático de 36 mostos e dos 36 vinhos monovariais correspondentes (não estufados), referentes às colheitas de 1998, 1999 e 2000. Deu-se especial atenção os compostos terpénicos e norisoprenóides, que por serem de origem varietal conferem aos vinhos uma certa tipicidade. São igualmente responsáveis por odores agradáveis e qualitativos, pelo que assumem um papel preponderante na caracterização aromática dos vinhos. Foram estudadas e optimizadas as condições experimentais de extracção dos componentes voláteis por microextracção em fase sólida (SPME), utilizando como adsorvente uma fibra de poliacrilato (PA-85 μ m), assim como, as condições instrumentais relativas à separação e identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

- Numa segunda fase, estudaram-se os compostos voláteis que, pela sua génese ou evolução durante a conservação e envelhecimento dos vinhos Madeira, podem contribuir para o seu “*bouquet*”.

- Por fim, ao conjunto de dados analíticos obtido, foi aplicada a análise estatística multivariável - *análise de componentes principais* e a *análise*

discriminante, de modo a detectar as principais fontes de variabilidade presentes no conjunto de dados, estabelecer relações entre as amostras e as variáveis, tentando diferenciar os diferentes vinhos de acordo com a casta de origem.

O estudo da caracterização aromática reveste-se de inegável interesse ao nível enológico, na medida em que está relacionada com aspectos produtivos, económicos e de qualidade. Sendo a produção de vinhos uma actividade de reconhecida tradição e importância na economia regional e nacional, os estudos que se efectuem têm a vantagem de poder contribuir para o conhecimento e defesa das nossas Denominações de Origem, e para o aumento da qualidade dos nossos produtos. Consequentemente, podem contribuir para um melhor posicionamento dos produtores face a mercados cada vez mais globais, mas também uma concorrência e um grau de exigência muito elevado.

1.2 APRESENTAÇÃO GERAL DO VINHO MADEIRA

Desde os tempos mais remotos, o vinho tem vindo a desempenhar 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 literatura tornando-se fonte de lendas e inspiração de mitos.

1.2.1 Historial do vinho Madeira

O início da cultura da vinha na Ilha da Madeira deve-se ao Infante D. Henrique que, com o objectivo de obter para Portugal o comércio dos vinhos, até então dominado pelos Genoveses e Venezianos, e antevendo as potencialidades da plantação de vinhas na Ilha da Madeira, enviou cepas da casta Malvazia para a Ilha recentemente descoberta e ordenou a sua produção imediata (Vieira, 1991).

As primeiras plantações foram efectuadas por volta de 1470, mas só no início do Séc. XVI se produzia vinho suficiente para comercialização, inicialmente vendido, para fins medicinais, aos marinheiros de passagem pela Ilha que o utilizavam para prevenir o escorbuto.

Desde o Séc. XVI, que o vinho surge como um importante produto ao nível das trocas externas da Ilha, mas só a partir da década de 70 do século seguinte, se firmou como o produto dominante de troca com o exterior, surgindo nos Séc. XVIII e XIX como a principal fonte de receitas da região. O vinho começa deste modo a assumir uma posição relevante na estrutura económica da Ilha.

Inicialmente o mercado europeu, nomeadamente o Inglês, destacou-se como o consumidor preferencial do vinho Madeira, continuando nos Séc. XVII a XIX com as colónias inglesas como principais compradoras. Na segunda metade do Séc. XIX surgem os países nórdicos da Europa como importante destino do vinho Madeira.

A conturbada conjuntura política da primeira metade do Séc. XIX, aliada ao aparecimento do oídio em 1852 e da filoxera vinte anos mais tarde, conduziram a uma situação de crise na produção e comércio do vinho, com graves implicações sócio-económicas.

Primeiramente o vinho Madeira não era fortificado, mas a necessidade de estabilizar o vinho durante as longas viagens para os diferentes mercados, tornou a adição de aguardente vínica (fortificação) uma prática comum.

Até meados do Séc. XVIII apenas se conhecia o envelhecimento e tratamento do vinho em canteiro. A partir de então foram experimentados novos processos de vinificação; primeiro com a adição de álcool vínico e posteriormente com a *estufagem* por volta de 1794 (Vieira, 1991). Este último processo generalizou-se e actualmente, quase todo o vinho Madeira é submetido à *estufagem*, exceptuando os produzidos pelas castas nobres que são envelhecidos pelo tradicional processo de *canteiro*. A *estufagem* do vinho surge, como consequência do afamado “*vinho de roda*”. O vinho que, como lastro, fazia a travessia da zona tropical nos porões das naus sofria um envelhecimento prematuro conferindo-lhe um paladar muito apreciado. Assim, a primeira estufa surgiu com a finalidade de substituir esta onerosa situação fazendo com que o vinho aquecido artificialmente, *in situ*, adquirisse as propriedades dos que passavam os trópicos. Os resultados foram de tal modo satisfatórios que, em princípios do Séc. XIX, generalizou-se o uso deste sistema, mantendo-se até à actualidade como uma das principais fases do processo de vinificação.

A vinha e o vinho passaram momentos difíceis e de concorrência com outros produtos, nomeadamente a cana-de-açúcar, até à necessária e completa reconversão da viticultura madeirense. Todavia, a permanente solicitação do mercado europeu,

pressionou e acelerou a necessária reconversão a qual foi acompanhada por um aumento da qualidade. A política comunitária aliada ao empenho dos produtores e das autoridades locais propiciaram uma nova era para o comércio do vinho Madeira.

Actualmente, a par do turismo, é um dos pilares da economia da região, rendendo no ano de 2001, aproximadamente, 12 milhões de euros (Fonte: IVM). Dos países membros da União Europeia a França, o Reino Unido e a Alemanha (figura 1.1), são os que mais apreciam este precioso néctar produzido na Madeira. Como principais compradores extra comunitários destacam-se o Japão, os Estados Unidos da América e o Canadá (estimativa correspondente aos anos 1990-2001).

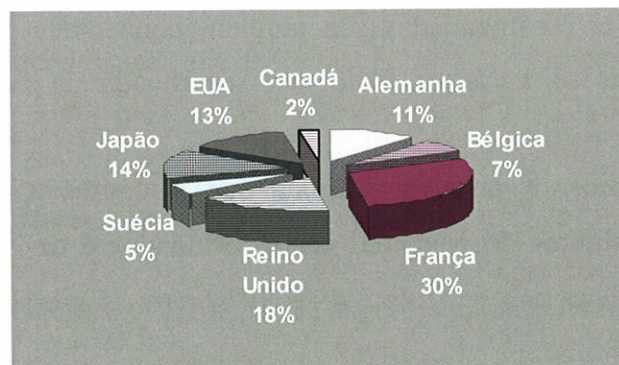


Figura 1.1 - Principais países consumidores de vinho Madeira (Fonte: IVM).

1.2.2 Castas recomendadas para a produção de vinho Madeira

Os primeiros colonizadores consideraram o solo e o clima da Ilha da Madeira ideais para o cultivo das vinhas. Estas crescem um pouco por todo o lado, em “poios” de pequenas dimensões e na globalidade são propriedade privada. A maioria estão plantadas no Sul (até aos setecentos metros) e Norte da Ilha (até aos trezentos metros), sendo a zona Leste a que produz menos. As vinhas, constituídas pelas castas recomendadas, destinadas à produção de vinho generoso da Madeira deverão estar plantadas em terrenos apropriados.

A Região Demarcada da Madeira possui um conjunto de castas “recomendadas” e outro de castas “autorizadas” para a produção do vinho Madeira (Decreto Lei nº 418/85; de 21 de Outubro).

Actualmente as castas recomendadas são:

Branças: Boal, Malvazia Cândida, Sercial, Verdelho Branco e Terrantez;

Tintas: Bastardo, Tinta da Madeira, Malvazia Roxa, Verdelho Tinto e Negra Mole.

E as castas autorizadas :

Branças: Carão da Moça, Moscatel de Málaga, Malvazia Babosa, Malvazia Fina, Rio Grande, Valveirinha, Listrão e Caracol;

Tintas: Tinta Negro, Complexa, Deliciosa e Triunfo.

As castas brancas recomendadas são também conhecidas por castas nobres, enquanto que das tintas só a *Negra Mole* tem significado na produção do vinho generoso.

Em termos médios, é possível afirmar que a composição percentual das diferentes partes constituintes do bago das castas estudadas é de $72,8 \pm 4,6$ % (m/m) para a polpa, $23,9 \pm 3,9$ % para a película e $4,1 \pm 1,1$ % para as grainha (Câmara, *et al.*, 2000).

Nos últimos anos têm sido cultivadas, com sucesso, diversas castas com vista à produção de vinho de Mesa.

As características ampelográficas das castas estudadas neste trabalho, são abaixo descritas. As fotografias dos cachos de uvas das diferentes variedades foram gentilmente cedidas pela Eng^ª. Carlota Ferreira da Divisão de Viticultura do IVM.

1.2.2.1 Boal

Possivelmente oriunda da região de Bordéus, na França, cultiva-se na zona Norte da Ilha e no Campanário, Calheta, Ponta do Pargo e Câmara de Lobos na costa Sul.

Apresenta folhas médias pentagonais, geralmente com cinco lóbulos, sendo os superiores bem aparentes e os inferiores mal esboçados.

Os cachos são médios (15-20 cm), de média compactidade, com um peso médio de, aproximadamente, 260 gramas; apresenta um pedúnculo médio e de média lenhificação.

Os bagos são médios (1,5 gramas, em média), uniformes, de forma arredondada e de cor verde amarelada; a película, de espessura fina e hilo pouco aparente, possui pruina; a polpa é mole e suculenta; o pedicelo tem comprimento médio e é de difícil separação.

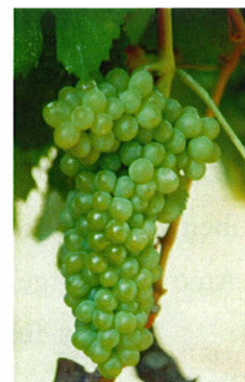


Figura 1.2 – Cacho de uvas representativo da casta Boal.

É uma casta de produtividade média dando origem a vinhos maduros, muito encorpados, aromáticos e meio doces.

1.2.2.2 Malvazia

Os dados existentes (Vieira, 1991) sugerem a sua proveniência da Ilha de Creta, na Grécia. Foi a primeira a ser plantada na Madeira, por ordem do Infante D. Henrique.

É cultivada nas imediações de S. Jorge e Santana no Norte da Ilha, e em Câmara de Lobos e Estreito de Câmara de Lobos no Sul, a 200-300 metros de altitude.



As folhas são médias, pentagonais geralmente com cinco lóbulos muito profundos e normalmente pontiagudos.

Os cachos são médios a grandes (20-30 cm), frouxos e com um peso médio de 300-400 gramas, com pedúnculo médio a longo e fraca lenhificação.

Figura 1.3 – Cacho de uvas representativo da casta Malvazia.

Os bagos são médios a grandes (2,3 gramas, em média), não uniformes, de forma elíptica e de cor verde amarelada; a película de espessura fina e hilo aparente, possui pruina; a polpa é mole e suculenta; o pedicelo tem comprimento médio e é de difícil separação. É uma casta de produtividade baixa a média dando origem a vinhos de cor alambreada, doces e muito aromáticos.

1.2.2.3 Sercial

Provavelmente proveniente das margens do rio Reno, mais precisamente de Riesling (Alemanha), cultiva-se principalmente nas áreas do Seixal, Ribeira da Janela, Jardim da Serra, Fajã da Ovelha, Ponta do Pargo e Arco de S. Jorge.

As suas folhas são médias, pentagonais, com cinco a sete lóbulos.

Os cachos são pequenos (12-15 cm), compactos e com um peso médio de 140-200 gramas, com pedúnculo médio e de forte lenhificação.



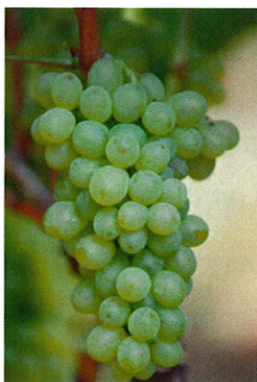
Figura 1.4 – Cacho de uvas representativo da casta Sercial.

Os bagos são pequenos (0,9 gramas, em média), não uniformes, de forma achatada e de cor verde amarelada; a película espessa e hilo aparente, possui pruina; a polpa é rija e pouco succulenta; o pedicelo é curto e de difícil separação.

É uma casta de média produtividade dando origem a vinhos de cor alambreada, secos e de excelente qualidade.

1.2.2.4 Verdelho

A origem desta variedade não é muito precisa, mas consta que foi plantada antes do Séc. XV em Portugal Continental. A sua constituição botânica é muito semelhante à da casta “*Gouveio*” cultivada no Alto Douro. É cultivada na Ribeira da Janela, Funchal, Câmara de Lobos e Estreito de Câmara de Lobos.



As suas folhas são médias, pentagonais, geralmente com cinco lóbulos pouco profundos ou apenas esboçados.

Os cachos são pequenos a médios (10-18 cm), compactos e com um peso médio de 100-120 gramas, com pedúnculo médio e de forte lenhificação.

Figura 1.5 – Cacho de uvas representativo da casta Verdelho.

Os bagos são médios (1,5 gramas, em média), uniformes, achatados e de cor verde amarelada; a película de média espessura e hilo pouco aparente, possui pruina; a polpa é rija e pouco suculenta; o pedicelo é curto e de difícil separação.

É uma casta pouco produtiva dando origem a vinhos meio secos com um evidente sabor a noz.

1.2.3 Factores naturais

Do ponto de vista geológico, a região da Madeira apresenta grande uniformidade. Assenta essencialmente em rochas eruptivas e materiais piroclásticos, com predominância das primeiras. Também existem formações sedimentares mas em extensão relativamente pequena. Morfologicamente pode considerar-se na Ilha da Madeira a existência de uma alta região central com imponentes maciços montanhosos, com um relevo muito acidentado, marcado por vales muito profundos, por desníveis abruptos de paredes quase verticais e por declives em geral acentuados. O litoral desenvolve-se normalmente em escarpas de grande imponentia, as quais chegam a atingir desníveis da ordem dos 500-600 metros. A sua frequência e extensão são maiores na costa Norte do que na Sul.

Os solos de natureza vulcânica, constituídos essencialmente por basaltos e cinzas ricas em ferro e fósforo, apresentam pouca profundidade e são ligeiramente ácidos a neutros.

A Madeira está sujeita aos ventos alísios que atingem o território durante a maior parte do ano. Este facto, a sua situação geográfica e as particularidades morfológicas próprias, fazem com que as condições climáticas das regiões Norte e Sul difiram bastante entre si. Esta diferenciação é muito importante em termos de definição da área vinícola, conduzindo ao aparecimento de duas áreas com características próprias, de que resultará um vinho diferente, conhecido no Séc. XVIII como vinho do Norte e do Sul.

Genericamente o clima da Madeira, fortemente influenciado pela orografia da Ilha, é predominantemente temperado com características oceânicas, variando de seco a húmido e de moderadamente a excessivamente chuvoso com o aumento da altitude. Na parte Norte da Ilha comparativamente à parte Sul, para as mesmas altitudes, o clima é

sempre mais chuvoso e caracteriza-se por temperaturas mais baixas. A temperatura média do ar varia com a altitude e com a zona da Ilha. Em Agosto, o mês mais quente, a temperatura média é de 22,4 °C e em Fevereiro, o mês mais frio, é de 15,4 °C. A média anual da humidade relativa varia desde os 55 % na costa até aproximadamente 90 % na zona dos nevoeiros (500-600 metros de altitude); a partir daqui a humidade volta a diminuir com a altitude chegando a um valor próximo dos 75 %.

No que se refere à quantidade anual de precipitação, verifica-se um aumento nítido com a altitude desde cerca dos 500 mm na costa Sul ou 1000 mm na costa Norte até aos 3200 mm nas zonas mais altas do interior.

1.2.4 Aspectos fitotécnicos

Os amanhos que apresentam características particulares são a *enxertia*, a *poda* e a *rega*. Relativamente à enxertia, quando realizada no local definitivo, o método mais comum é o *enxerto de fenda simples*; quando é realizada a enxertia na mão (enxertos prontos) utiliza-se o *enxerto ómega*. Regra geral as plantações fazem-se com plantação do bacelo e posterior enxertia no local definitivo. Actualmente a maioria dos viticultores optam pela plantação de enxertos prontos. Os porta-enxertos mais comuns são o R99 e o 1103-P. A escolha do porta-enxerto depende da natureza do solo vitícola e das características da casta com que vai ser enxertado. A poda é realizada anualmente durante o período de repouso vegetativo. A irrigação da vinha só poderá ser feita a título excepcional caso as condições climáticas o justifiquem.

Coexistem na Região o sistema de condução tradicional designado de “*latada*” com altura de 1,5 a 2 metros, com outro mais moderno em “*espaldeira*” ou “*bardo*”. A densidade de plantação, dependente do sistema de condução, ronda os 3000-5000 pés/ha. O terreno livre por debaixo das latadas é aproveitado para diversas plantações, contribuindo para o arejamento e fertilização do próprio solo.

1.2.5 Produção

A área geográfica correspondente à Denominação de Origem “Madeira” abrange toda a Região Autónoma da Madeira (RAM).

De acordo com o Recenseamento Geral Agrícola de 1999 (DRE), da superfície total plantada em vinha, aproximadamente 1520 hectares, somente cerca de 414 hectares estão autorizados a produzir vinho Madeira. Esta escolha baseia-se em vários factores de avaliação do potencial qualitativo.

O rendimento máximo permitido (Decreto Lei nº 418/85; de 21 de Outubro) para o vinho Madeira é de 80 hL de mosto por hectare, e o seu grau alcoólico natural não poderá ser inferior a 9 % (vol.). Estes valores poderão ser ajustados em anos particulares. A vindima ocorre quando a uva atinge uma boa maturidade.

O mapa da figura 1.6 ilustra os locais de cultivo das castas nobres de maior dimensão e importância.



Figura 1.6 – Locais de cultivo, de maior importância, das castas nobres.

As variedades e os locais de implantação das vinhas são seleccionadas em função de parâmetros edafo-climáticos e culturais, principalmente a localização, altitude, natureza do solo e rendimento.

O gráfico da figura 1.7, mostra-nos a evolução da produtividade do vinho generoso nos últimos 8 anos (Fonte: IVM).

A produtividade média verificada neste período foi de, aproximadamente, $49,4 \pm 9,5$ milhares de hectolitros.

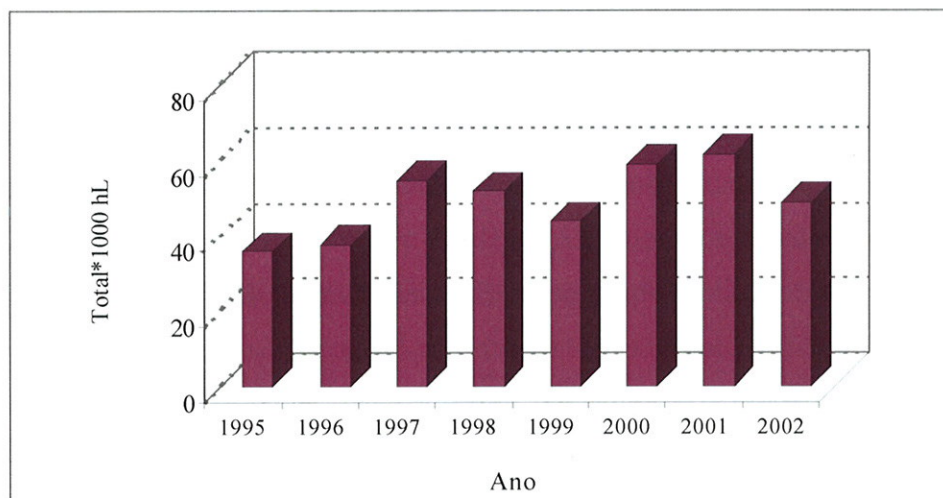


Figura 1.7 – Evolução da produção do vinho Madeira nos últimos oito anos (Fonte: IVM).

1.2.6 Tecnologia de vinificação

Se é certo que o vinho depende directamente da casta que é utilizada e das condições agroclimáticas da região, não é menos certo que no caso do vinho Madeira a estes factores acresce o processo de vinificação *sui generis*.

À semelhança de muitos outros vinhos licorosos, como o Porto e o Moscatel de Setúbal, o vinho Madeira é obtido a partir do sumo de uvas frescas que fermentam de modo a que reste algum açúcar residual, o qual vai condicionar o carácter doce ou mais seco do vinho.

Podem considerar-se cinco etapas fundamentais no processo de produção do vinho Madeira :

i) *Vindima e recepção das uvas*: as uvas das castas recomendadas, em bom estado fitossanitário e com a graduação mínima aconselhável, provenientes de diferentes locais da Ilha, são colhidas manualmente e colocadas em caixas apropriadas de 35-50 kg onde são transportadas para as instalações de vinificação. É efectuada uma pesagem em balanças apropriadas e determinado o álcool provável. São em seguida enviadas para tegões que vão alimentar a linha de obtenção de mosto ou são introduzidas nos equipamentos que permitam a sua obtenção.

ii) *Extracção do mosto*: este processo é normalmente efectuado por recurso a um desengaçador-esmagador que retira o engaço e esmaga os bagos enviando-os para uma bomba de massas que por sua vez conduz as uvas esmagadas para a prensa. Estas operações são comuns à maioria dos produtores.

A partir de então, e consoante o tipo de vinho a obter, existem dois processos alternativos: *bica aberta* (1) e *curtimenta* (2). No processo de *bica aberta*, as massas obtidas do esmagamento são prensadas, esgotando-se o sumo que segue para fermentação precedida ou não de maceração. Na *curtimenta*, a fermentação processa-se com as películas em contacto com o mosto, procedendo-se à prensagem depois de terminado o processo fermentativo.

O mosto deverá possuir um título alcoolométrico natural mínimo de 9 % (vol.). É sulfitado antes da fermentação à razão de 50 mg de SO₂ por litro de mosto. A acidez fixa dos mostos varia consoante a casta estando compreendida entre 8-12 g.L⁻¹ em ácido tartárico.

iii) Fermentação alcoólica: ocorre em cascos ou cubas de aço inoxidável ou cimento revestidas por um material inerte. Tradicionalmente não se adicionam leveduras. A temperatura de fermentação é controlada, processando-se esta entre 20-22 °C, para os vinhos brancos, e entre 22-26 °C, no caso dos vinhos tintos.

Para os mostos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*, a fermentação é interrompida por adição de álcool de origem vínica a 96 % (vol.). Esta interrupção ocorre no momento em que a quantidade de açúcar não fermentado confere ao vinho o grau de doçura desejado, que difere consoante a casta.

Relativamente ao mosto *Boal*, a adição de álcool ocorre após a obtenção de 6 ou 7 % (vol.) de álcool por fermentação, equivalente a uma massa volúmica de 1050 g.cm⁻³. A quantidade de álcool vínico adicionado de modo a elevar o teor alcoólico ao valor desejado, é neste caso de 14-16 % relativamente ao volume total. No mosto *Malvazia*, a adição de álcool ocorre após a obtenção de 4 % (vol.) de álcool por fermentação, equivalente a uma massa volúmica de 1060 g.cm⁻³. A quantidade de álcool vínico adicionado é de 16-18 % relativamente ao volume total. No que se refere ao mosto *Verdelho*, o álcool é adicionado após a obtenção de 7 % (vol.) de álcool por fermentação, correspondente a uma massa volúmica de 1020 g.cm⁻³. A quantidade de álcool vínico adicionado é de 12-14 % relativamente ao volume total. Para o mosto *Sercial*, a fermentação ocorre na totalidade adicionando-se 8-10 % de álcool vínico relativamente à quantidade total.

O álcool vínico deve respeitar alguns parâmetros físico-químicos e sensoriais, sendo este controlo da responsabilidade do IVM.

Além da interrupção da actividade das leveduras, a alcoolização favorece a dissolução dos polifenóis e provoca a precipitação de substâncias insolúveis.

iv) *Operações tecnológicas*: procede-se à clarificação dos lotes alcoolizados de vindima, por adição de bentonites e/ou gelatinas. Após um período de aproximadamente 30 dias, os vinhos são trasfegados para cascos ou tanques completamente libertos de borras. Após a trasfega, são analisados química e organolepticamente, sendo classificados e loteados de acordo com os resultados da análise. Caso necessário procede-se a um ajuste do teor alcoólico. Os melhores lotes de vinhos produzidos durante um ano excepcional podem ser seleccionados para uma eventual declaração de “*Frasqueira*”.

A partir desta fase os vinhos são seleccionados para o processo de envelhecimento.

v) *Conservação/envelhecimento*: o envelhecimento das principais categorias de vinho da Madeira está organizado de modo diferenciado consoante o tipo de vinho que se pretende: ou são sujeitos a um envelhecimento prematuro por *estufagem*, ou envelhecem de acordo com o sistema mais antigo e generalizado em todo o arquipélago, o *sistema de canteiro*.

O processo de *estufagem* consiste em aquecer os vinhos, a uma temperatura entre os 50-55 °C (aumento gradual de 5 °C/dia), onde se mantêm ao abrigo do ar por um período mínimo de 90 dias. Segue-se um período de estágio de 90 dias findo o qual o vinho está em condições de ser submetido às diversas operações de acabamento de modo a garantir a qualidade necessária. Após a *estufagem*, os vinhos poderão, se necessário, sofrer nova clarificação, com utilização de gomas ou filtros de terras diatomáceas, seguida de trasfega.

Consoante a qualidade e idade do vinho este pode ser classificado como: “*Frasqueira*” datado, feito exclusivamente de uma só casta e com um estágio mínimo de 22 anos (20 anos em cascos de carvalho e 2 anos em garrafa); “*Colheita*” vinho monovarietal com um estágio mínimo de 10 anos em cascos de carvalho; “*Reserva Extra*” com uma casta nobre presente em pelo menos 85 % e estágio obrigatório mínimo de 15 anos; “*Reserva Especial*” com mais de 10 anos de estágio; “*Reserva*” com um estágio mínimo de 5 anos.

Os vinhos são envelhecidos em cascos ou cubas praticamente lotados. O vinho Madeira envelhecido pelo *sistema de canteiro*, só poderá ser considerado em condições

de engarrafamento ou de exportação decorridos, pelo menos, 36 meses após a última alcoolização. O vinho Madeira submetido à *estufagem* só poderá ser engarrafado e como tal comercializado, decorridos pelo menos 12 meses após a *estufagem*.

A figura 1.8 resume o conjunto de processos de elaboração e envelhecimento dos diferentes tipos de vinho Madeira.

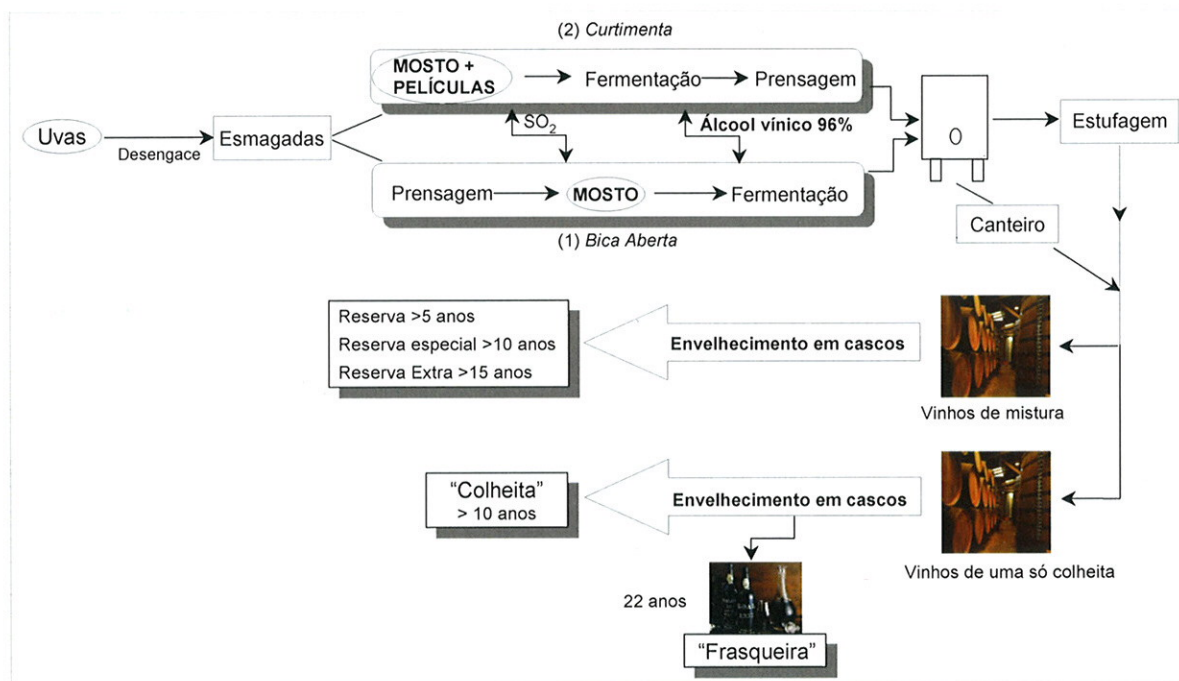


Figura 1.8 - Processos de elaboração e envelhecimento do vinho Madeira.

A natureza e capacidade dos recipientes são adaptados ao tipo de evolução desejado, sendo habitualmente conservados em cascos de 640 litros, em tonéis de 2500 a 3000 litros ou em cubas de grandes quantidades. Os recipientes em madeira representam mais de 2/3 da quantidade total. A madeira mais utilizada é o carvalho português e americano sendo também utilizadas outras madeiras exóticas.

Os processos adoptados na estabilização físico-química e microbiológica são similares aos utilizados na generalidade dos vinhos.

1.2.7 Controlo e certificação

O controlo e certificação dos vinhos Madeira são garantidos, quer pelos Laboratórios de Controlo de Qualidade das empresas produtoras, quer pelo laboratório

do Instituto do Vinho Madeira (laboratório Acreditado desde 2002), que além de controlar a qualidade desempenha diversas outras funções na defesa e promoção do vinho da região.

A importância de identificar e quantificar alguns componentes do vinho, alguns dos quais, quando se encontram em concentrações superiores às admissíveis, de acordo com as normas nacionais e internacionais, representam um perigo toxicológico, justificam o estrito controlo analítico e organoléptico do vinho Madeira, efectuado pelo laboratório de análise e pela câmara de degustação do IVM ao longo do seu processo de elaboração.

Por outro lado, considerando a quantidade de vinho Madeira exportado anualmente (32000 hL, em média), torna-se necessário e imperioso controlar rigorosamente os parâmetros físico-químicos e organolépticos, por forma a confirmar a autenticidade e prevenir ou detectar possíveis adulterações.

É também da responsabilidade do IVM, verificar por meio das contas correntes, os stocks de vinho dos produtores. Este organismo encarrega-se igualmente de organizar o registo dos tipos de vinho e emitir os certificados de garantia. Se os vinhos apresentarem os critérios de qualidade requeridos, podem obter o selo de garantia, obrigatório para a sua comercialização com a denominação de “vinho Madeira”.

1.2.8 Papel do envelhecimento na composição química

O envelhecimento é certamente uma das etapas mais importantes da elaboração do vinho Madeira. A duração e as condições em que se processa são determinantes sobre a qualidade do produto final. O processo tem uma incidência ainda mais importante no caso do vinho Madeira dado que a sua durabilidade, em certos casos, pode atingir várias dezenas de anos.

Esquemáticamente podemos diferenciar, em função da sua origem, três grandes grupos de compostos. Distinguem-se, deste modo, as substâncias provenientes da uva que participam do aroma primário, as produzidas no decurso da fermentação alcoólica, designadas de aroma secundário e finalmente as provenientes de reacções químicas que ocorrem durante o tempo de armazenamento e que constituem o aroma terciário ou “*bouquet*”.

Estudos comparativos da composição química de diferentes vinhos, revelam que cada vinho é dotado de características próprias que o diferencia dos demais. As diferentes etapas percorridas ao longo do processo de elaboração explicam esta heterogeneidade, inicialmente, ao nível da matéria prima e da fermentação e posteriormente, ao nível do processo de envelhecimento, durante o qual está sujeito a eventuais alterações microbiológicas entre outras.

Não obstante todas estas fontes de variabilidade, durante o envelhecimento do vinho ocorrem um conjunto de reacções químicas e enzimáticas que modificam a sua composição e lhe confere uma certa similaridade. Estas transformações, traduzidas na alteração da cor e das características organolépticas do vinho envelhecido relativamente ao vinho novo, são tanto mais perceptíveis quanto maior for o tempo de armazenamento.

1.2.9 Características organolépticas

Os diferentes tipos de vinho Madeira assentam principalmente nas castas nobres de que são elaborados e das quais recebem os nomes por que são colocados à disposição do consumidor. O *Sercial* é o mais seco, de cor âmbar, com reflexos alaranjados e ácido. O *Verdelho* é menos seco que o *Sercial*, de cor amarelo-acastanhado, sabor a madeira, caramelo e queimado. O *Boal* é meio doce, rico de aroma e sabor. O *Malvazia* é doce, muito aromático e macio.

A flagrante tipicidade e originalidade destes vinhos são o resultado, por um lado, das características do solo, clima e factores sócio-económicos, e por outro, das peculiaridades das castas e das formas de cultivo da vinha.

Os vinhos produzidos na Região estão aptos a ostentar a designação DOC (*Denominação de Origem Controlada*), uma das mais antigas denominações de origem do país, categoria mais alta dos VLQPRD (*Vinho Licoroso de Qualidade Produzido em Região Demarcada*; EU No 3111, 1993) desde que satisfaçam os requisitos impostos pelos estatutos da Região Demarcada da Madeira, outra legislação Nacional e Comunitária.

1.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS DAS UVAS E DOS VINHOS

Entre as diferentes variedades de uvas cultivadas na Região Demarcada da Madeira, as castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* distinguem-se pela sua superior qualidade, estando perfeitamente adaptadas ao solo arenoso que caracteriza a região, assim como às condições climáticas.

De um modo geral a uva é um fruto pouco aromático, podendo nalguns casos não emitir qualquer odor. Só as uvas de castas do tipo *Moscatel* e *Cabernet-Sauvignon*, têm uma tipicidade particular encontrada posteriormente nos vinhos (Darriet *et al.*, 1991; Bayonove *et al.*, 1974).

As substâncias aromáticas, de grande complexidade de composição e origem, não se encontram uniformemente distribuídas pelas diferentes partes do bago, estando repartidas de forma diversa (figura 1.9).

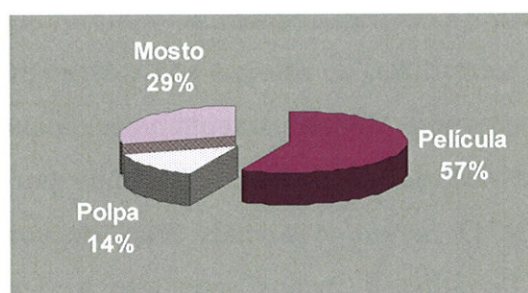


Figura 1.9 – Distribuição das substâncias voláteis nas diferentes partes do bago (Bayonove *et al.*, 1993).

De acordo com Bayonove *et al.*, (1993) mais de metade destas substâncias encontram-se nas células internas de película.

Dos vários factores que contribuem para a agradabilidade e aceitabilidade de um vinho, o aroma é possivelmente o mais importante, constituindo uma das suas mais importantes características organolépticas definidoras da sua qualidade e da sua tipicidade (Bayonove *et al.*, 1993; Rapp e Mandery, 1986). É influenciado por factores ambientais (solo e clima), pela variedade, pela ecofisiologia e fitotecnia da vinha, pelos fenómenos bioquímicos pré-fermentativos (oxidações e hidrólises), pelas condições em que decorre a fermentação (pH, temperatura, microflora), pelas técnicas de vinificação,

pelos vários processos de pós-fermentação (clarificações, colagens, filtrações) a que o vinho é submetido e pelas condições de armazenamento e envelhecimento. Todos estes parâmetros determinam a excepcional complexidade do aroma do vinho, tendo sido identificados até à data algumas centenas de compostos voláteis em uvas e vinhos de diferentes castas (Schreier, 1979; Cordonnier e Bayonove, 1981).

Esta complexidade aromática está associada a compostos de diversas famílias químicas: *ésteres, álcoois, terpenos, fenóis voláteis, ácidos gordos voláteis*, entre outras, acrescida pela vasta gama de concentrações dos constituintes do aroma que vão desde os nanogramas a alguns miligramas por litro, associada às interações odoríficas que ocorrem. Podem notar-se efeitos de adição e mesmo de sinergia. Enquanto que alguns odores diferentes, mas de intensidades comparáveis, são imiscíveis ficando intactos na mistura, outros misturam-se e anulam-se. Alguns provêm da uva, caracterizando a variedade que lhe deu origem, outros são revelados durante os processos de obtenção do mosto, sendo a maioria formados durante os processos fermentativos e outros durante a conservação e envelhecimento do vinho.

Estudos efectuados por Günata *et al.*, (1985), Bayonove *et al.*, (1974a), entre outros, reconhecem a relação entre o carácter de um vinho e os compostos voláteis das uvas e mostos nomeadamente os terpenóis e norisoprenóides, considerados os compostos mais importantes na definição do aroma varietal de um vinho típico de uma determinada casta (Bayonove *et al.*, 1993).

1.3.1 Classificação e origem

No que se refere à sua origem, e atendendo à longa sequência biológica, bioquímica e tecnológica empregue na elaboração do vinho, podemos adoptar uma classificação que diferencie os aromas de acordo com a sua proveniência (figura 1.10).

Assim, diferenciam-se os aromas característicos da variedade de uva de onde provêm – *aromas primários ou varietais*, dos provenientes das uvas e revelados durante o processamento da vindima e operações subsequentes – *aromas pré-fermentativos*, dos originados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica – *aromas secundários ou fermentativos*, e dos resultantes das reacções enzimáticas e

físico-químicos de oxidação e redução, que ocorrem durante a conservação e envelhecimento do vinho – *aromas pós-fermentativos ou terciários*.

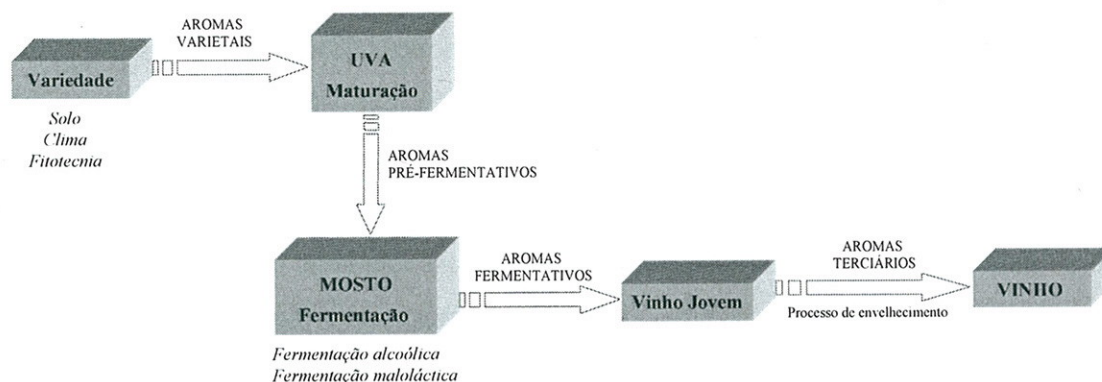


Figura 1.10 – Sequência biotecnológica da produção de vinho e sua relação com os diferentes tipos de aroma (Bayonove, 1993).

A divisão adoptada para descrever os diferentes grupos químicos responsáveis pelo perfil aromático do vinho, está de acordo com a adoptada por Ribéreau-Gayon *et al.*, (2000).

1.3.2 Aromas primários ou varietais

O *aroma varietal* é formado pelos compostos característicos da variedade de uva de onde provêm (Rapp, 1990). Dependem essencialmente da variedade mas também do solo, do clima, da fitotecnia e da fisiologia da vinha, do estado sanitário e do grau de maturação da uva. São determinantes na qualidade e tipicidade aromática dos vinhos. São na sua maioria, *os terpenóis* (característicos das uvas e vinhos das castas *Moscatéis*), *os norisoprenóides em C₁₃* (abundantes na casta *Chardonnay*) e as *metoxipirazinas* (características da família dos *Cabernet*).

Recentemente têm sido identificados alguns *tióis* que contribuem de forma importante para o aroma de algumas castas, nomeadamente as *Cabernet-Sauvignon*, *Sauvignon Blanc* e *Merlot*.

Este tipo de aroma pode não ser directamente reconhecido na uva (*Moscatel* e *Cabernet-Sauvignon*), mas somente se revelar no decurso da fermentação e/ou da conservação do vinho (Cordonnier *et al.*, 1986).

Ao aroma varietal está subjacente o conceito de precursor do aroma – substâncias não voláteis e não odorantes como glicósidos, ácidos fenólicos, ácidos gordos e conjugados da cisteína, capazes de originar compostos aromáticos pela acção de enzimas específicas, ao longo do processo de vinificação e durante a conservação e envelhecimento do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Bayonove *et al.*, 1998; Cordonnier *et al.*, 1986). Podem considerar-se ainda como precursores alguns compostos odoríferos ou não e que pela sua instabilidade se transformam em substâncias odoríferas.

No potencial aromático da uva, além do aroma varietal livre e dos precursores de aromas, pode englobar-se o aroma pré-fermentativo uma vez que tem a sua origem em precursores existentes na uva (figura 1.11).

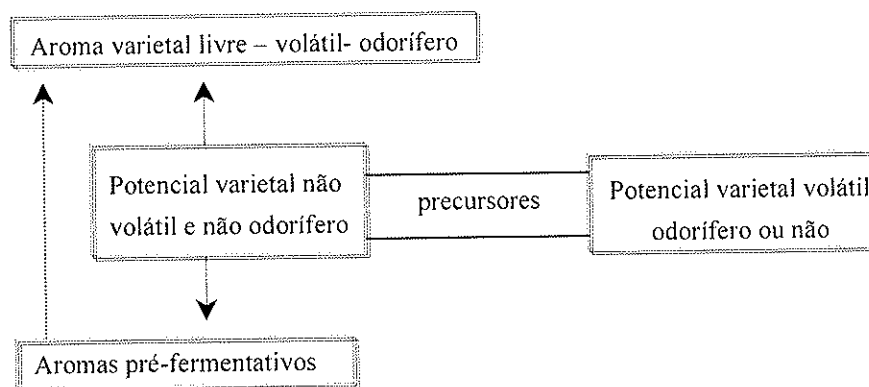


Figura 1.11 - Potencial aromático da uva (adaptado de Baumes *et al.*, 1994).

1.3.2.1 Monoterpenóis

Os monoterpenóis constituem um exemplo de substâncias de origem varietal. Assumem um papel preponderante na caracterização aromática de um vinho. Por um lado são de origem varietal conferindo-lhe uma certa tipicidade (Bayonove *et al.*, 1993), por outro são responsáveis por odores agradáveis (essencialmente florais e frutados) e qualitativos, justificando o facto de serem considerados as principais

substâncias do aroma (Rapp, 1995). Intervêm não só na tipicidade das castas aromáticas, mas também na das castas não aromáticas (Bayonove *et al.*, 1993).

De acordo com os estudos de Rapp e Mandery (1986), as transformações sofridas por estes compostos nas diferentes fases de fabrico do vinho são mínimas, possibilitando a caracterização dos vinhos provenientes de diferentes castas.

Nas plantas, os terpenóis desempenham diversas funções na manutenção da fluidez da membrana, no transporte de electrões, na glicosilação das proteínas e na regulação do desenvolvimento celular. Bayonove *et al.*, (1993) realçam ainda o envolvimento destes compostos no metabolismo das plantas quer a nível dos mecanismos de oxidação da glucose com libertação de ATP, quer na síntese de hormonas, fitoesteróis e carotenóides, quer ainda como produtos de acumulação, formados durante a dormência de certos vegetais, como resultado da actividade enzimática, diminuindo assim o risco de acumulação de substâncias tóxicas ou inibidoras (McCaskill e Croteau, 1998).

Nas uvas os compostos terpénicos podem ser encontrados na forma livre, por isso odorantes, e na forma ligada não volátil formando glicósidos que agem como precursores do aroma ao longo do processo de vinificação (Cordonnier e Bayonove, 1974). A existência da fracção livre e ligada nas uvas, tem sido continuamente demonstrada (Le Chevanton, 1993; Razungles *et al.*, 1993; Günata, 1984), encontrando-se os compostos ligados, na maioria das castas, em maior concentração que os livres.

A biossíntese dos terpenóis, investigada em leveduras, animais e algumas plantas aromáticas, não foi estudada especificamente para as uvas. No entanto, atendendo à similaridade dos esquemas metabólicos nos diversos organismos estudados, é lógico pensar que no caso das uvas as vias biossintéticas sejam semelhantes (Bayonove *et al.*, 1998; Bayonove *et al.*, 1992).

No processo biossintético (figura 1.12) dos terpenóis podem diferenciar-se várias etapas (Rohmer, 1999; McCalskill e Croteau, 1998).

A primeira etapa corresponde à formação do ácido mevalónico (MVA), composto chave na biossíntese dos terpenos, a partir da glucose via acetil-CoA. Esta etapa envolve a condensação de três moléculas de acetil-CoA para formar o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) que é reduzido a MVA por acção da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase (Chappell, 1995). De seguida o MVA sofre uma série de

reacções de fosforilação, descarboxilação e desidratação originando o isopentilpirofosfato (IPP). Na segunda etapa, por acção da isopentilpirofosfato isomerase, o IPP é isomerizado a dimetililpirofosfato (DMAPP). Estas duas unidades isoprénicas, IPP e DMAPP, desempenham uma função determinante na síntese dos terpenóis: o DMAPP é considerado como unidade de partida sendo o IPP a unidade repetitiva.

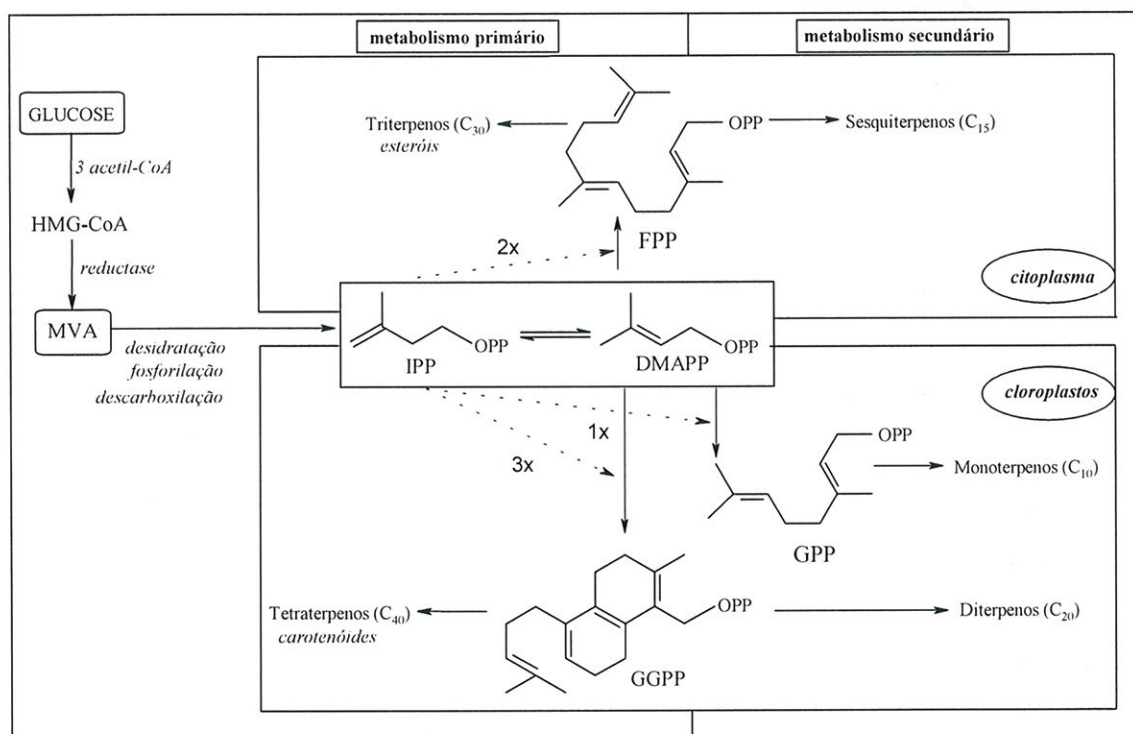


Figura 1.12 - Biossíntese dos terpenóis nas plantas (adaptado de Bohlmann et al., 1998).

Posteriormente através de uma série de reacções destas duas unidades em C₅, catalisadas por *prenil-transferases*, são sintetizados o geranylpirofosfato (GPP) que origina os monoterpenos, o farnesilpirofosfato (FPP) que origina os sesquiterpenos, e o geranylgeranylpirofosfato (GGPP) que origina os diterpenos (Bohlmann et al., 1998; Chappell, 1995).

Não é fácil estabelecer uma comparação directa das diferentes castas no que se refere aos teores de monoterpenóis uma vez que os resultados quantitativos disponíveis na literatura são obtidos utilizando diferentes técnicas analíticas e são referentes a amostras provenientes de diversas regiões e de anos diferenciados.

Na tabela 1.1 estão registados alguns valores para os principais monoterpénis em mostos de diferentes castas.

Tabela 1.1 Teores dos monoterpénis livres mais representativos em mostos de diferentes castas.

Castas	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)					
	linalol	α -terpineol	citronelol	nerol	geraniol	Ho-trienol
<i>Muscat d'Alexandrie</i> ^a	455	78	nd	94	506	nd
<i>Muscat de Frontignan</i> ^a	473	87	nd	135	327	nd
<i>Gewürztraminer</i> ^b	6	3	12	43	218	nd
<i>Riesling</i> ^b	40	25	4	23	35	25
<i>Muscadelle</i> ^b	50	12	3	4	16	nd
<i>Sauvignon</i> ^b	17	9	2	5	5	nd
<i>Alvarinho</i> ^{c,d}	80	37	nd	97	58	127
<i>Loureiro</i> ^{d,e}	112	12	nd	0,2	0,8	7
<i>Maria Gomes</i> ^f	64	22	nd	nd	54	57
<i>Bical</i> ^f	7	3	nd	nd	nd	10

nd: não detectado; a – Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; b – Günata, 1984; c – Falqué-Lopez *et al.*, 1994; d – Oliveira, 2001; e – Falqué *et al.*, 2002; f – Rocha *et al.*, 2000.

A distribuição dos monoterpénis livres nas diferentes partes do bago depende da casta e do composto. Estudos efectuados por alguns investigadores (Freitas *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 1986; Günata *et al.*, 1985), revelaram que a maior percentagem destes compostos encontra-se na película.

Nas castas *Muscat de Frontignan* e *d'Alexandrie*, 90 % do geraniol e do nerol situam-se na película. O linalol distribui-se equitativamente na película e na polpa (Razungles *et al.*, 1993; Günata *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1984). A fracção ligada é igualmente mais abundante na película. Na maioria das castas a fracção ligada é mais abundante que a fracção livre. Na *Muscat d'Alexandrie* a forma livre do geraniol e citronelol é mais abundante que a forma ligada. Nesta casta, o linalol livre é o composto mais abundante na polpa. Na *Muscat de Frontignan*, o α -terpineol livre é também mais abundante que o ligado.

Na uva existe um balanço complexo dos compostos do aroma e dos seus glicósidos. Verifica-se que a glicólise redistribui os monoterpénos pelas diferentes partes da uva já que, ao contrário do que acontece com as formas livres, os glicósidos

de nerol, geraniol e linalol encontram-se uniformemente distribuídos pelas diferentes partes do bago.

No que respeita aos óxidos de linalol, os óxidos pirânicos existem sobretudo na forma livre e foram encontrados em maior quantidade na polpa. Pelo contrário, os óxidos furânicos existem sobretudo na forma ligada e encontram-se distribuídos uniformemente nas diferentes partes da uva. Assim, enquanto a fracção ligada dos terpenóis existe aproximadamente nas mesmas proporções relativas nas diferentes partes da uva, as formas livres do nerol e do geraniol localizam-se sobretudo na película (Bayonove, 1993). Estes resultados além de demonstrarem a importância da maceração pelicular no aroma, revelam a importância de processos que permitam a libertação dos terpenóis existentes na forma glicosilada (Wilson *et al.*, 1986).

No decurso da maturação o teor de terpenóis livres e ligados aumenta (Park e Noble, 1993; Günata *et al.*, 1985a; Wilson *et al.*, 1984). A fracção ligada é a mais abundante desde o estado herbáceo (250 a 500 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$), enquanto que os terpenóis livres existem em quantidades diminutas (30-90 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$). Alguns terpenóis, casos do α -terpineol e do citronelol, não são detectados neste estágio. Ao longo da maturação a fracção ligada continua superior à fracção livre. A partir da fase do pintor ocorre um aumento substancial de terpenóis livres até à maturação. A partir deste estado fenológico, os teores de alguns terpenóis, casos do linalol, do α -terpineol e do citronelol diminuem (Rapp, 1988) contrariamente ao geraniol e nerol cujos teores aumentam (Razungles *et al.*, 1993). Alguns autores referem uma acumulação contínua destes compostos (Park e Noble, 1993; Wilson *et al.*, 1984); outros (Günata, 1984; Marais, 1983) advogam uma diminuição de monoterpenóis antes da acumulação máxima de açúcares no bago.

De acordo com Noble *et al.*, (1988) durante a fermentação e conservação, a fracção livre dos monoterpenóis na casta *Muscat d'Alexandrie* aumenta enquanto que a fracção ligada diminui devido à hidrólise ácida. Os mesmos investigadores verificaram que o teor de geraniol diminui durante a fermentação, de 49 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que o teor de α -terpineol, 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no mosto, aumenta ligeiramente durante a fermentação para 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e posteriormente para 70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ao fim de 13 meses a uma temperatura de 10 °C. Este aumento do α -terpineol durante a conservação é resultado da isomerização em meio ácido de outros monoterpenóis livres como o linalol, nerol e geraniol (figura 1.30).

1.3.2.1.1 Principais constituintes de origem terpénica

Foram já identificados, nas uvas e nos vinhos, cerca de uma centena de compostos terpénicos (Bayonove *et al.*, 1998; Bayonove, 1993). Entre eles encontram-se: *hidrocarbonetos terpénicos em C₁₀* pouco interessantes olfactivamente (limoneno, α -terpineno, p-cimeno, mirceno) ou *sesquiterpenos* como o farneseno, γ -cadineno e γ -muroloeno; *vários álcoois terpénicos* que conferem odores fortes e típicos de “flores” (rosa, tília) e também de “mel” e “cera”; alguns *álcoois sesquiterpénicos* como o farnesol ou o γ -cadinol; *vários óxidos furânicos e pirânicos* que regra geral são muito menos odorantes que os terpenóis; alguns *aldeídos* – geranial, neral, citronelal, bastante odoríferos mas mais agressivos que os álcoois correspondentes; e os *dióis terpénicos*, que embora não apresentando propriedades olfactivas de interesse, podem actuar como precursores de compostos odoríferos.

Na figura 1.13 representam-se as estruturas químicas dos principais álcoois monoterpénicos encontrados nas uvas e nos vinhos.

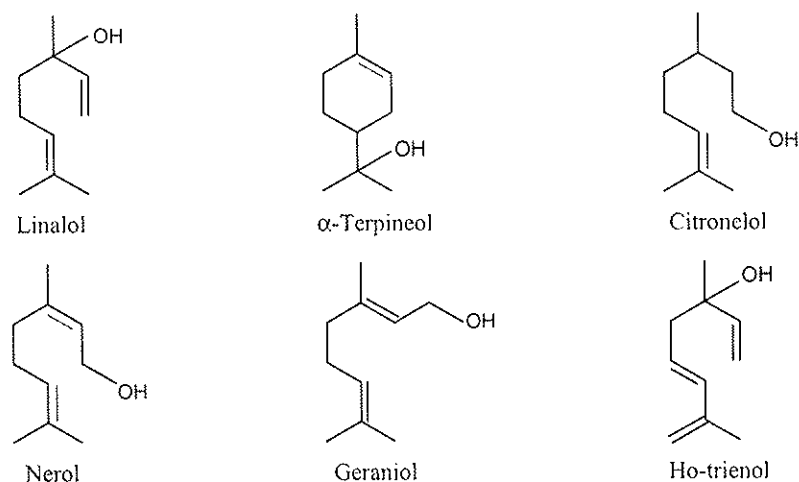


Figura 1.13 – Estrutura dos principais álcoois monoterpénicos encontrados nos vinhos.

Os mais comuns e interessantes do ponto de vista olfactivo são, o linalol (coentros, anis), o α -terpineol (pinho e tília), o nerol (rosas, lima), o geraniol (rosas), o citronelol (limão, citrinos) e o Ho-trienol (tília) (Mateo e Jiménez, 2000).

Nas castas Moscatéis encontram-se, geralmente, em concentrações superiores ao seu limiar de percepção olfactiva (LPO) (tabela 1.1), contribuindo de forma decisiva para o aroma das mesmas.

Encontram-se na maioria das castas, aromáticas ou não, sensivelmente nas mesmas proporções relativas, mas são nas castas Moscatéis que se encontram em teores bastante elevados, representando 40 a 50 % das substâncias voláteis quantificáveis, a que correspondem concentrações da ordem dos 500 a 1700 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Günata *et al.*, 1985; Dimitriadis e Williams, 1984). A abundância dos monoterpenóis nas castas Moscatel pode ser devida a uma maior actividade do sistema enzimático e/ou a um teor mais elevado dos respectivos precursores (Bayonove e Cordonnier, 1971).

Na tabela 1.2, apresentam-se os limiares de percepção olfactiva e os descritores aromáticos, de alguns dos monoterpenóis mais importantes para o aroma das uvas e dos vinhos.

Tabela 1.2 Limiares de percepção e descritores aromáticos de alguns dos álcoois e óxidos terpénicos mais importantes do aroma das uvas e dos vinhos.

Composto	Limiares de percepção ^{a,b,e,f} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Descritores aromáticos ^{b,c,d,f}
linalol	50 ^a ; 80 ^b ; 100 ^{a,c}	coentros, anis, floral
α -terpineol	110 ^f ; 400 ^b	pinho, tília, lírio
citronelol	18	limão verde, citronela
Ho-trienol	110	tília
nerol	400-500	rosa, lima, floral
geraniol	100; 130	rosa, floral
<i>cis</i> -óxido de rosa	0,2	verde, floral
óxido de nerol	100	fruto verde

a – Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; b – Meilgaard, 1975; c – Miller *et al.*, 1987; d – Dugelay *et al.*, 1992; e – Simpson, 1979; f – Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000.

1.3.2.2 Norisoprenóides em C₁₃

Outro grupo de compostos com grande interesse olfactivo, apesar das concentrações extremamente baixas em que se encontram, são os norisoprenóides em C₁₃ (Razungles e Bayonove, 1996). Derivam da degradação oxidativa dos carotenóides,

(tetraterpenos) (Enzell, 1985). Estão presentes na uva e no vinho em quantidades diminutas, da ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$, mas conferem aos vinhos notas de grande qualidade aromática, uma vez que possuem limiares de percepção olfactiva bastante baixos. É o caso da β -ionona (odor a violeta), da β -damascenona (odor a frutos exóticos), do 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidronaftaleno (TDN) (odor a querosene), dos vitispiranos (odor a cânfora e eucalipto), do teaspirano (odor a chá e rosa), da 6-metil-5-hepten-1-ona (odor a frutos verdes e vegetal), da 6-metil-3,5-heptadecan-2-ona (odor a canela e noz de coco), da isoforona (odor a menta e vegetal), da β -damascona (odor a rosa, tabaco e frutado), do 3-oxo- α -ionol (odor a tabaco) e dos isómeros *cis*- e *trans*- do edulano (odor a tabaco). Muitos destes compostos são responsáveis pelos odores típicos e fortes que caracterizam determinados vinhos.

Na tabela 1.3, descrevem-se os limiares de percepção olfactiva e os descritores aromáticos de alguns dos norisoprenóides mais abundantes encontrados nos vinhos.

Tabela 1.3 Algumas características dos norisoprenóides em C_{13} mais comuns (Ribéreau-Gayon et al., 2000; Williams et al., 1991).

Composto	Teor em vinhos (ng.L^{-1})		Limiar de percepção ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Descritores aromáticos
	brancos (n=12)	tintos (n=64)		
β -ionona	0-59	0-2451	0,8	violeta
β -damascenona	89-1505	5-6460	0,045	flores, frutos exóticos
TDN	0-200 $\mu\text{g.L}^{-1}$		20	querosene
vitispiranos I e II	ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$		800	eucalipto, cânfora

Quimicamente, os norisoprenóides em C_{13} podem dividir-se em dois grupos: *megastigmanos* (exp: β -damascenona e a β -ionona) e *não-megastigmanos* (exp: TDN, vitispirano e actinidol), incluindo cada um deles um número elevado de compostos voláteis. Alguns dos norisoprenóides do segundo grupo, podem formar-se a partir dos *megastigmanos* por reacções químicas em meio ácido (Winterhalter, 1993).

Entre os *megastigmanos*, a β -damascenona e a β -ionona são os mais frequentemente encontrados nos vinhos. A β -damascenona, com odor a “frutos” e “flores exóticas” e a “compota de maçã”, é responsável pelo aroma típico dos vinhos *Chardonnay*. A β -ionona tem sido identificada em várias castas brancas incluindo moscatéis (Etiévant et al., 1983; Schreier et al., 1976).

Entre os *não-megastigmanos*, o mais importante é o TDN, típico dos vinhos *Riesling* velhos aos quais confere notas a “querosene” (Simpson, 1978).

Como os monoterpenóis, os norisoprenóides existem sobretudo na forma de precursores não voláteis, pouco odorantes, sendo libertados essencialmente durante a conservação do vinho, como resultado de hidrólises ácidas e enzimáticas, originando compostos com forte impacto aromático como é o caso da β -damascenona. Contrariamente ao que inicialmente se suponha (Strauss, *et al.*, 1987), a neoxantina não é o único precursor dos norisoprenóides em C_{13} . Este carotenóide é o precursor da β -damascenona (figura 1.14).

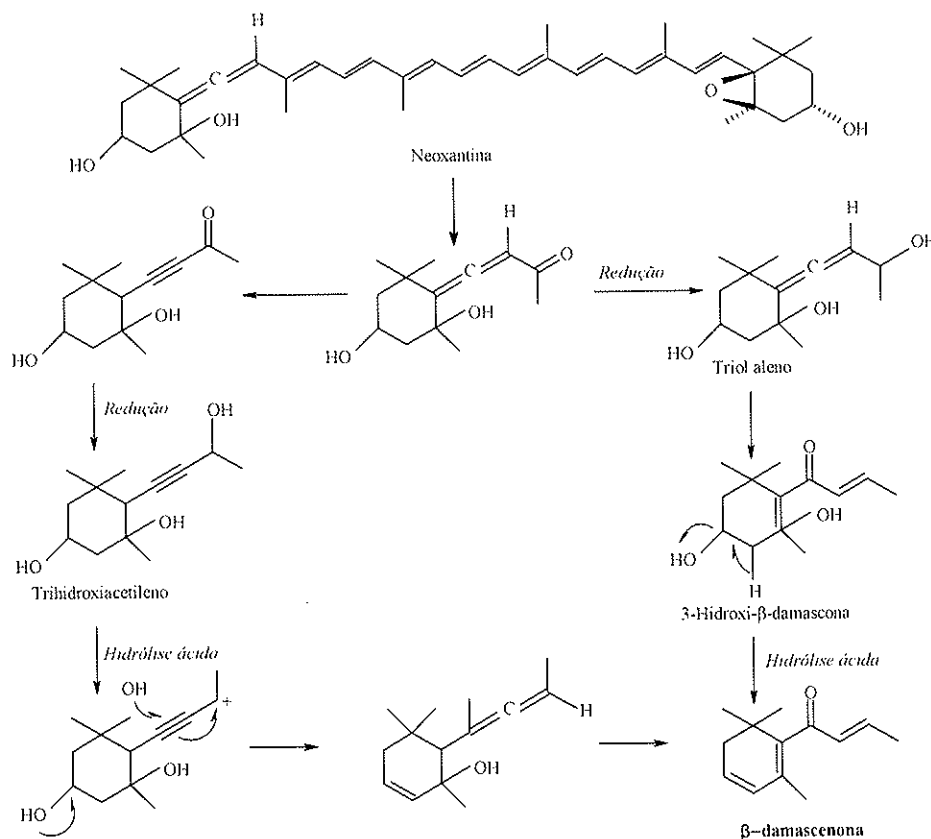


Figura 1.14 - Possível mecanismo de formação da β -damascenona a partir da neoxantina (adaptado de Chevance *et al.*, 2002)

De acordo com Williams *et al.*, (1991), a luteína é o precursor da megastigmatrienona, enquanto que o precursor do TDN e do vitispirano é a violaxantina.

Ao longo da maturação os norisoprenóides apresentam uma evolução similar à dos monoterpenóis. A partir da fase do pintor verifica-se uma diminuição do teor em carotenóides acompanhada de um aumento dos teores dos norisoprenóides em C_{13} (TDN, vitispiranos, entre outros). Este aumento deve-se à degradação oxidativa dos carotenóides, graças à intervenção das enzimas da uva, seguido de mecanismos de glicosilação (Razungles e Bayonove, 1996). A exposição solar durante a maturação aumenta a cinética de degradação dos carotenóides (Razungles e Bayonove, 1996; Marais, 1983), originando teores de TDN e vitispirano superiores. Todavia os níveis de β -damascenona e da megastigmatrienona não são afectados pela exposição solar (Marais *et al.*, 1992).

A temperatura e o pH afectam os níveis de norisoprenóides. Baixas temperaturas e elevados valores de pH, favorecem a conservação da β -damascenona e o atraso na formação do TDN (Simpson e Miller, 1983).

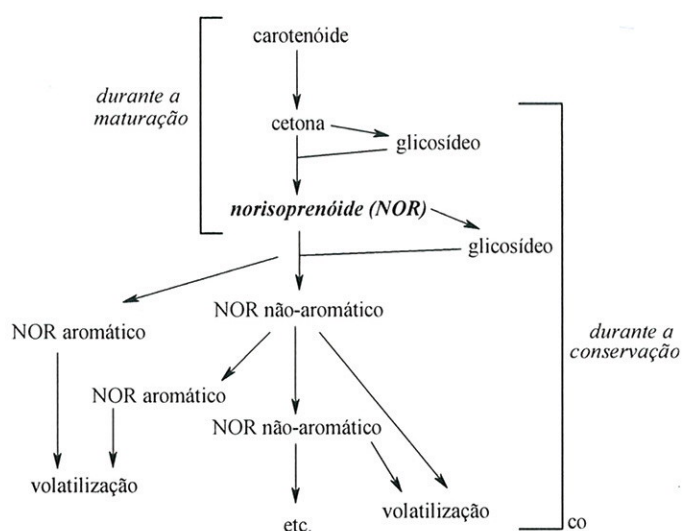


Figura 1.15 – Evolução dos norisoprenóides em C_{13} (adaptado de Guth, 1999).

A conservação do vinho em casco de madeira conduz a um aumento da concentração da megastigmatrienona conferindo ao vinho nuances a “tabaco”. O arejamento conduz a uma diminuição dos teores de norisoprenóides dada a volatilidade destes compostos.

Na figura 1.15, representa-se um diagrama esquemático da evolução dos norisoprenóides durante a maturação das uvas e envelhecimento dos vinhos.

1.3.2.3 Metoxipirazinas

As metoxipirazinas são compostos heterocíclicos azotados, provenientes do catabolismo dos aminoácidos. Embora a sua origem não esteja completamente elucidada nas uvas nem nos vegetais em geral, os aminoácidos leucina, isoleucina e valina, e o glicoxal, são frequentemente citados como possíveis precursores (Murray e Whitfield, 1975). Uma das vias de formação que tem sido proposta está exemplificada na figura 1.16 (Allen e Lacey, 1999).

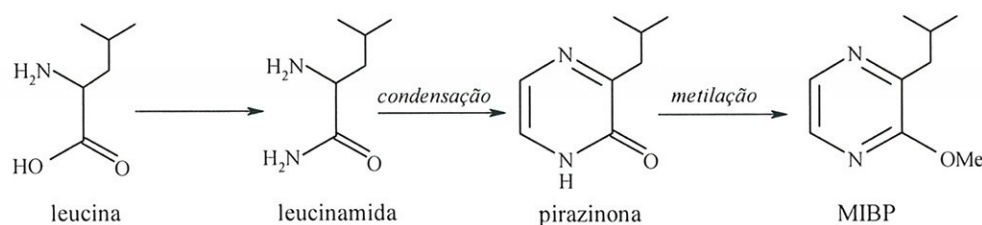


Figura 1.16 - Possível mecanismo de formação da 2-metoxi-3-isobutilpirazina a partir da leucina (adaptado de Allen e Lacey, 1999).

As mais abundantes e de maior impacto olfactivo são: a 2-metoxi-3-isobutilpirazina (MIBP), a 2-metoxi-3-sec-butilpirazina (MBP) e a 2-metoxi-3-isopropilpirazina (MIPP). Destas, a MIBP é a que existe em maior quantidade, tipicamente com uma concentração oito vezes superior à das outras pirazinas. Também já identificadas em vinhos, a 2-metoxi-3-metilpirazina e a 2-metoxi-3-etilpirazina, são muito menos odoríferas do que aquelas.

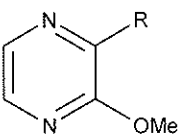
Foram identificadas em uvas e vinhos das castas *Cabernet-Sauvignon* (Allen *et al.*, 1994; Bayonove *et al.*, 1974), *Sauvignon Blanc* e *Merlot* (Lacey *et al.*, 1991), aos quais conferem notas vegetais e terrosas que lembram o “pimento verde” e os “espargos”.

Apesar dos LPO extremamente baixos, 1 a 2 ng.L⁻¹ na água e em vinhos brancos, e 10-15 ng.L⁻¹ em vinhos tintos (tabela 1.4), somente a MIBP e a MIPP parecem contribuir para o aroma das variedades referidas.

A 2-metoxi-3-isobutilpirazina (MIBP) foi identificada no vinho *Cabernet-Sauvignon*, pela primeira vez, em 1975 por Bayonove *et al.*, (1995). Embora estejam presentes no vinho em concentrações bastante baixas, o carácter herbáceo dos vinhos

Sauvignon Blanc e *Cabernet-Sauvignon*, está associado à presença das 3-alkil-2-metoxipirazinas. Allen *et al.*, (1994) propuseram um limiar de percepção olfativo de 2 ng.L⁻¹ na água e no vinho, tendo mais recentemente, Kotseridis *et al.*, (1999) determinado um LPO de 0,5 ng.L⁻¹ na água e de 10 ng.L⁻¹ em vinhos tintos.

Tabela 1.4 Principais pirazinas encontradas nas uvas e nos vinhos, limiares de percepção olfativos (em água) e descritores aromáticos correspondentes.

	Pirazina	Limiar de percepção (ng.L ⁻¹)	Descritores aromáticos ^{a,b}
	R=CH ₂ CH(CH ₃) ₂ : 2-metoxi-3-isobutilpirazina	2	pimento verde
R=CH(CH ₃) ₂ : 2-metoxi-3-isopropilpirazina	2	pimento verde, terra	
R=CH ₂ CH ₃ : 2-metoxi-3-etilpirazina	400	pimento verde, terra	
R=CH(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃ : 2-metoxi-3-sec-butilpirazina	1	pimento verde	

a – Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; b – Bayonove *et al.*, 1998

Estes mesmos autores estudaram a influência de alguns parâmetros vitícolas e de fabrico do vinho nos teores da IMP. O grau de maturação da uva (Lacey *et al.*, 1991), o tipo de solo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), o clima e a luz (Allen *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1991; Heymann *et al.*, 1986) e o tempo de maceração (Sala e Mestres, 2000), são factores que influenciam decisivamente os teores destes compostos, cujo teor parece diminuir rapidamente a partir da fase do pintor (Lacey *et al.*, 1991).

As vinhas das zonas frias ou temperadas originam vinhos mais ricos em pirazinas que as das zonas quentes. O mesmo se verifica com as uvas que se desenvolvem na sombra cujo teor em pirazinas pode ser três vezes superior às expostas ao sol, devido provavelmente à fotosensibilidade destes compostos (Heymann *et al.*, 1986).

Sala *et al.*, (1991) verificaram que o aumento do tempo de maceração conduz a um aumento dos teores de pirazinas nos vinhos *Cabernet-Sauvignon* e *Merlot*, indicando que estes compostos se encontram em maior percentagem na película do que na polpa ou grainha.

A influência do tipo de solo no teor das pirazinas deve-se ao seu efeito no crescimento vegetativo. Para a casta *Cabernet-Sauvignon*, solos argilosos originam vinhos com teores de pirazinas mais elevados do que outros tipos de solo (Ribéreau-

Gayon *et al.*, 2000). Os teores encontrados nas uvas são similares aos determinados nos vinhos. São compostos importantes na caracterização varietal dos vinhos das castas *Cabernet-Sauvignon*, *Sauvignon Blanc* e *Merlot*.

1.3.2.4 Tióis voláteis

Foram identificados em vinhos, compostos da família dos *tióis*, com propriedades aromáticas interessantes, quer pelo limiar de percepção extremamente baixo que possuem quer pelos descritores aromáticos que lhes estão associados.

Assim, as notas a “buxo”, a “giesta”, a “toranja” e a “maracujá”, típicas dos vinhos das castas *Sauvignon Blanc*, *Gewürztraminer*, *Riesling*, *Pinot Gris*, *Muscat d'Alsace*, *Pinot Blanc*, *Sylvaner*, *Colombard*, *Petit Manseng*, e *Semillon* (Tominaga *et al.*, 2000), podem ser explicadas pela presença de alguns dos tióis voláteis (Tominaga e Dubourdieu, 2000).

Na tabela 1.5 apresentam-se os limiares de percepção olfactivos e os descritores aromáticos de tióis voláteis presentes nos vinhos de algumas variedades.

Tabela 1.5 Limiares de percepção olfactivos e descritores aromáticos de alguns dos principais tióis voláteis.

Composto	Limiares de percepção ^a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Descritores aromáticos ^{b,c}
	água	solução modelo ^c	
4-mercapto-3-metilbutan-1-ol	1300	1500	alho francês
4-mercapto-4-metilpentan-2-ol	20	55	citrinos
4-mercapto-4-metilpentan-2-ona	0,1	0,8	buxo, giesta
3-mercaptohexan-1-ol	17	60	toranja, maracujá
acetato de 3-mercaptohexilo	2,0	4,0	buxo, maracujá

^a 12% etanol (v/v) + 5 g/l ácido tartárico; a – Tominaga *et al.*, 1998; b – Tominaga e Dubourdieu., 2000; c – Tominaga *et al.*, 2000

Os principais compostos deste grupo identificados são a 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, o acetato de 3-mercaptohexilo, o 4-mercapto-4-metilpentan-2-ol, o 3-mercaptohexan-1-ol e o 3-mercapto-3-metilbutan-1-ol (Darriet *et al.*, 1993).

Tratam-se de compostos com limiares de percepção extremamente baixos, da ordem dos nanogramas por litro, com excepção do 3-mercapto-3-metilbutan-1-ol cujo LPO é de $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3.3 Aromas pré-fermentativos

Os aromas pré-fermentativos são os que se desenvolvem no período compreendido entre a vindima e o início da fermentação. São resultantes das diversas operações tecnológicas a que as uvas são submetidas nomeadamente a vindima, o transporte, o esmagamento e a prensagem. Estes processos vão permitir que os sistemas enzimáticos presentes na uva entrem em contacto com os lípidos membranares libertando os ácidos gordos poliinsaturados - os *ácidos linoleico* e *linolénico* (figura 1.17).

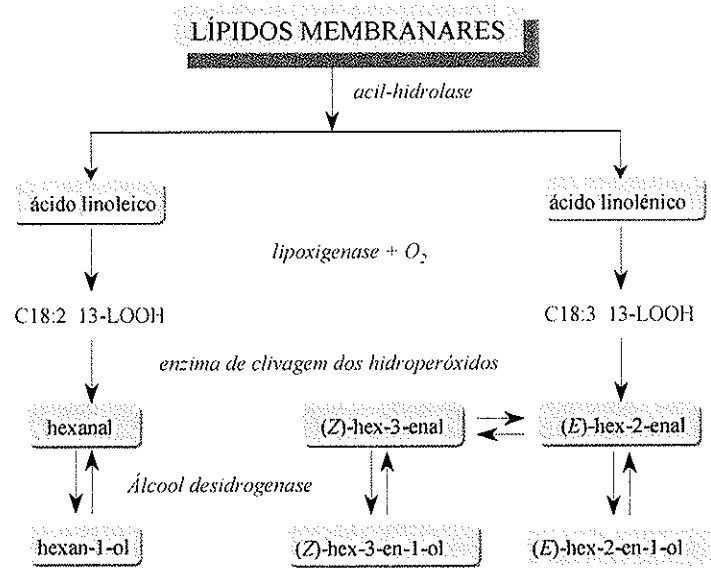


Figura 1.17 - Formação por via enzimática dos aldeídos e dos álcoois em C_6 a partir dos precursores da uva (adaptado de Crouzet *et al.*, 1998).

Por acção de uma *lipoxigenase* estes ácidos originam hidroperóxidos que servem de substrato a uma enzima de clivagem originando os aldeídos (Crouzet *et al.*, 1998; Crouzet, 1986). Por acção da *álcool desidrogenase* estes transformam-se nos

álcoois correspondentes (figura 1.17). Durante esta fase de intensa actividade enzimática, algumas das formas glicosiladas dos compostos terpénicos hidrolisam-se, com libertação de compostos voláteis tornando os mostos aromáticos.

Os compostos característicos do aroma pré-fermentativo são aldeídos em C₆, hexanal, (*Z*)-hex-3-enal e (*E*)-hex-2-enal e os álcoois correspondentes. Normalmente estão presentes nos mostos e nos vinhos em baixas concentrações (inferiores a 0,5 mg.L⁻¹), no entanto, devido aos limiares de percepção olfactiva relativamente baixos que apresentam, podem conferir aos mostos e aos vinhos aromas “herbáceos” e a “frutos verdes” (Crouzet *et al.*, 1998).

Os teores dos compostos em C₆ formados, dependem do estado de maturação do bago. De acordo com Cordonnier e Bayonove (1981) e Bayonove *et al.*, (1998), o maior potencial herbáceo atinge-se antes da maturação industrial. O bago verde origina nos vinhos quantidades máximas de aldeídos sendo estas cada vez menores até à maturação. Estes mesmos autores demonstraram que as operações tecnológicas desenvolvidas no processo pré-fermentativo, principalmente o esmagamento, a prensagem e a maceração, são factores com influência na formação destes compostos pelo arejamento intenso que provocam.

A prensagem parece favorecer o aumento dos teores de geraniol e nerol, que são maiores no mosto de prensa do que no mosto de gota. O linalol, pelo contrário, é mais abundante no mosto de gota. A maceração parece favorecer o geraniol e nerol em relação ao linalol (Bayonove *et al.*, 1976).

Alguns autores (Wilson *et al.*, 1986; Cordonnier *et al.*, 1986; Günata, 1984; Williams *et al.*, 1984), sugerem que o aroma do vinho pode ser substancialmente melhorado nesta etapa, se libertar o potencial aromático existente sob a forma de precursores glicosilados. Outros (Barillére *et al.*, 1990; Baumes *et al.*, 1989) salientam os efeitos benéficos da maceração pelicular no carácter organoléptico dos vinhos.

Apesar de existirem variedades muito ricas nestes compostos (Baumes *et al.*, 1988; Baumes *et al.*, 1989), não se podem considerar como substâncias características de uma determinada variedade (Joslin e Ough, 1978) já que a sua formação depende de vários factores, como descrito.

1.3.4 Aromas fermentativos

Os *aromas fermentativos* são produzidos pela acção das leveduras durante a fermentação alcoólica e pelas bactérias lácticas, caso ocorra a fermentação maloláctica. No decurso deste processo, a complexidade química e aromática dos vinhos aumenta significativamente como resultado de transformações químicas dos constituintes da uva e do mosto, ou produto do metabolismo das leveduras fermentativas ou das bactérias durante a fermentação maloláctica.

Formam-se nesta etapa, além do etanol e do glicerol, outros compostos em quantidades mais modestas mas que podem contribuir, de forma significativa, para o aroma global do vinho. São os álcoois superiores, os ácidos gordos voláteis e seus ésteres, e em menor extensão os aldeídos e outros componentes do aroma como lactonas e fenóis voláteis (Rapp e Versini, 1991; Cordonnier e Bayonove, 1979). Perdem-se alguns aldeídos e outros compostos voláteis (Cordonnier e Bayonove, 1979).

Formam-se também compostos que conferem aos vinhos aromas indesejáveis, casos do ácido sulfídrico, sulfuretos orgânicos e tióis (figura 1.18). Quando presentes em concentrações excessivas, o acetaldeído, o ácido acético, o acetato de etilo, os álcoois superiores e o diacetilo, também são considerados indesejáveis (Simpson, 1979).

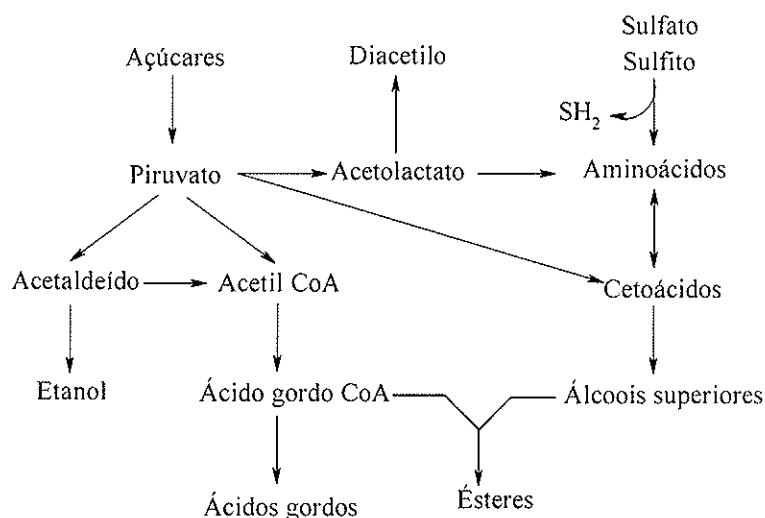


Figura 1.18 – Formação de compostos aromáticos pelas leveduras a partir dos açúcares, aminoácidos e enxofre (adaptado de Henschke e Jiranek, 1994).

A concentração e natureza destes compostos nos vinhos jovens depende da composição da uva, do tipo de levedura e das condições de fermentação.

Diversos autores (Antonelli *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 1988) verificaram que a estirpe de levedura tem influência na formação de álcoois superiores e ésteres e que as diferenças na composição aromática final do vinho, no que se refere a estes componentes, dependem mais da estirpe de levedura utilizada do que da composição inicial dos mostos.

A estirpe de levedura pode também influenciar o teor em compostos terpénicos do vinho (Cabrera *et al.*, 1988) devido à sua actividade enzimática. As leveduras enológicas possuem actividade β -glicosidásica, mas pouca actividade α -arabinosidásica e quase nenhuma actividade α -ramnosidásica (Delcroix *et al.*, 1994). No entanto a β -glicosidase da *Saccharomyces cerevisiae* tem um papel pouco preponderante na hidrólise dos precursores glicosilados devido à presença de glucose e etanol, sendo também pouco estável ao pH do mosto (Mateo e Di Stefano, 1997). As leveduras podem também transformar compostos terpénicos noutros (Di Stefano *et al.*, 1992) e algumas espécies da *Saccharomyces cerevisiae* têm a capacidade de sintetizar compostos deste grupo (Fagan *et al.*, 1981).

As condições em que decorre a fermentação são muito importantes na produção dos ácidos gordos voláteis e dos seus ésteres. Condições de anaerobiose, baixa temperatura de fermentação e clarificação dos mostos, são factores favoráveis à sua formação (Nykänen, 1986; Bertrand e Torres-Alegre, 1984).

Quantitativamente, os compostos aromáticos fermentativos representam a maior parte do aroma, sendo considerados responsáveis pelo carácter vinoso comum a todos os vinhos. Assumem um papel importante no aroma final dos vinhos resultantes de castas neutras, sendo menos perceptíveis nos vinhos provenientes de castas aromáticas (Montedoro e Ricci, 1989). O etanol participa no aroma final do vinho, quer directamente por se encontrar em quantidades superiores ao seu limiar olfactivo (0,1 a 100 mg.L⁻¹ em água) (Fazallari, 1978), quer indirectamente diminuindo a polaridade do meio e por conseguinte os coeficientes de partição ar/vinho da maioria dos constituintes do aroma (Bayonove *et al.*, 1998).

Saliente-se ainda que durante a fermentação alcoólica há perdas de compostos aromáticos por volatilização.

1.3.4.1 Álcoois superiores

Os álcoois superiores, protagonizam por si só e sobretudo pelos seus ésteres, um papel importante no “*bouquet*” do vinho, contribuindo com odores agradáveis quando em concentrações inferiores a 300-350 mg.L⁻¹ (Rapp e Mandery, 1986). A capacidade de produzir álcoois superiores é uma característica de todas as leveduras, dependendo a quantidade formada do género e da espécie de levedura, e da casta (Guidici *et al.*, 1993). Presentes nos mostos em baixas concentrações, encontram-se nos vinhos em concentrações relativamente elevadas, 150-550 mg.L⁻¹ de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.*, (2000).

A formação dos álcoois superiores (Lepe, 1995; Bidan, 1975) está relacionada com o metabolismo dos aminoácidos sendo, por isso, fortemente influenciada pelo teor de azoto presente nos mostos. São produzidos *catabolicamente* a partir de determinados aminoácidos por intermédio do mecanismo de Ehrlich - desaminação dos aminoácidos seguida de descarboxilação do ácidos α-cetónicos originando o aldeído correspondente com posterior redução (desidrogenação) ao álcool respectivo (figura 1.19). Este último processo parece desempenhar a importante função metabólica de controlar a reoxidação do NADH (Quain, 1988).

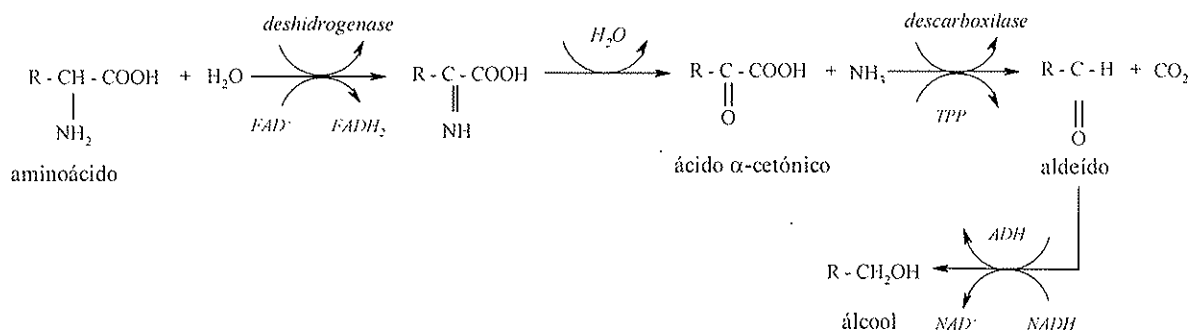


Figura 1.19 – Biossíntese dos álcoois superiores a partir dos aminoácidos de acordo com o mecanismo de Ehrlich (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Podem também formar-se, *anabolicamente*, a partir do metabolismo dos açúcares *via* piruvato tendo como intermediários os ácidos α-cetónicos. Exemplo é a formação do propan-1-ol formado a partir do ácido pirúvico. A figura 1.20 exemplifica o mecanismo de formação do propan-1-ol por esta via.

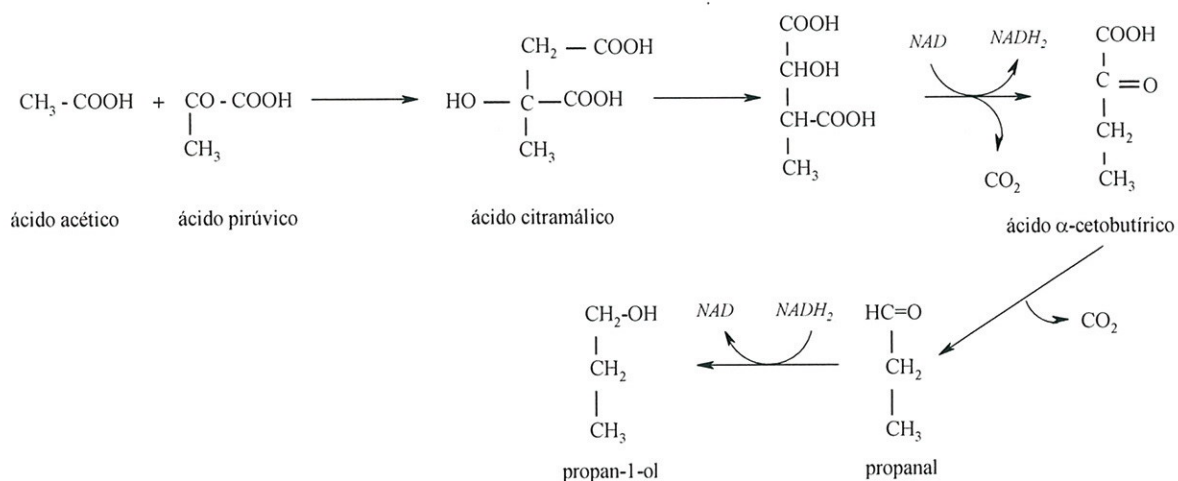


Figura 1.20 – Mecanismo de formação do propan-1-ol a partir dos ácidos pirúvico e acético (adaptado de Usseglio-Tomasset, 1995).

De acordo com Bayonove *et al.*, (1998), 75 % dos álcoois superiores são produzidos pelo catabolismo dos açúcares com os restantes 25 % a serem formados pela degradação dos aminoácidos. Estes valores são no entanto dependentes dos teores de azoto assimilável e de açúcares fermentáveis. Chen (1978), demonstrou que quanto maior o número de átomos de carbono do álcool, maior será a contribuição do mecanismo de Ehrlich para a sua formação.

Segundo Shultess e Ettliger (1978), as vias de regulação do metabolismo de formação dos álcoois superiores são determinadas pela fonte de azoto assimilável. Uma carência de azoto assimilável provoca uma acumulação de cetoácidos originando a formação de grandes quantidades de álcoois superiores. Contrariamente, a presença de quantidades elevadas de aminoácidos provoca uma retroinibição da via anabólica, diminuindo a quantidade de álcoois superiores formados por esta via (Ough e Bell, 1980).

Na tabela 1.6 descrevem-se alguns dos pares *aminoácido-álcool* formados por este mecanismo.

A produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica é influenciada pela espécie de levedura (Soufleros e Bertrand, 1979) e pela composição do meio: teor de açúcares, pH, conteúdo e fonte de azoto, temperatura de fermentação e arejamento (Soufleros e Bertrand, 1980).

Tabela 1.6 Aminoácidos precursores dos principais álcoois superiores encontrados nos vinhos^a.

Aminoácido	Cetoácido	Aldeído	Álcool
alanina	α -cetopropiónico	acetaldeído	etanol
serina	β -hidroxi- α -cetopropiónico	glioxal	glicol
2-aminobutírico	α -cetobutírico	propionaldeído	propan-1-ol
valina	α -cetoisovalérico	isobutiraldeído	2-metilpropan-1-ol
norvalina	α -cetovalérico	butiraldeído	butan-1-ol
isoleucina	α -ceto- β -metilvalérico	2-metilbutiraldeído	2-metilbutan-1-ol
leucina	α -cetoisocapróico	isovaleraldeído	3-metilbutan-1-ol
norleucina	α -cetocapróico	valeraldeído	pentan-1-ol
fenilalanina	β -fenilpirúvico	β -fenieletanal	2-feniletanol

a: Bidan, 1975.

De acordo com Guymon *et al.*, (1961) certas espécies, como a *Hansenula anomala*, produzem grandes quantidades de álcoois superiores, sobretudo em condições aeróbias. Peynaud e Guimberteau (1962), mostraram que a *Saccharomyces bayanus* produz quantidades de 2-feniletanol muito superiores às formadas pela *Saccharomyces cerevisiae*. Bertrand *et al.*, (1984), atribuem a formação do 2-metil-1-propanol a duas estirpes da *Saccharomyces*, a *kluyveri* e a *ludwigii*.

Di Stefano *et al.*, (1981) ao estudarem quatro estirpes de *Saccharomyces* verificaram diferentes potenciais na formação de compostos voláteis. A *cerevisiae* e a *italicos* produzem quantidades de ésteres e ácidos gordos superiores à *bayanus* e à *uvarun*. O acetato de etilo e o 2-feniletanol, são produzidos preferencialmente pela *bayanus* e pela *uvarun*, respectivamente.

Apesar de lhes ser atribuído um cheiro e sabor forte e pungente, com exceção do 2-feniletanol que confere aos vinhos odor a “rosas” (Simpson, 1979; Nykänen, 1986), quando presentes em concentrações inferiores a 300 mg.L⁻¹, podem contribuir de forma positiva para as características organolépticas dos vinhos (Rapp e Versini, 1995; Rapp e Versini, 1991; Rapp e Mandery, 1986).

Os principais álcoois superiores de origem fermentativa são os álcoois alifáticos 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol e o álcool aromático 2-feniletanol. Presentes em quantidades entre 1 e 50 mg.L⁻¹ encontram-se o propan-1-ol, o butan-1-ol, o butan-2-ol, o hexan-1-ol, o 3-metilbutan-2-ol, o decan-1-ol e o tirosol (Curvelo Garcia, 1988; Bidan, 1975).

Na tabela 1.7 indicam-se alguns limiares de diferença e descritores aromáticos associados aos álcoois superiores.

Tabela 1.7 Limiares de diferença olfactiva e descritores aromáticos de alguns álcoois superiores do vinho e cerveja.

Álcoois superiores	Teores em vinhos brancos (mg.L ⁻¹)	Limiares de diferença (mg.L ⁻¹)		Descritores aromáticos ^{b,c}
		vinho ^a	cerveja ^b	
propan-1-ol	1-125	500, 750	800	álcool
2-metilpropan-1-ol	9-170	200	200	álcool
butan-1-ol	0,003-8,5	150	450	álcool
butan-2-ol	---	---	16	álcool
2-metilbutan-1-ol	8-150	200	200	álcool, banana, medicinal solvente
3-metilbutan-1-ol	6-490	60	70	álcool, banana, adocicado,
pentan-1-ol	0,008-5,1	---	---	balsâmico
hexan-1-ol	0,3-12	4	4	coco, folhas verdes, herbáceo,
(Z)- hex-3-en-1-ol	0,01-0,85	---	13	erva verde
(E)- hex-2-en-1-ol	0,05	---	15	folhas verdes
octan-1-ol	0,09-1,5	0,8	---	químico
oct-1-en-3-ol	---	---	0,2	cogumelo
álcool benzílico	0,008-0,42	---	900	suor
2-feniletanol	4-197	^c 100	125	rosas, mel, maçã, adocicado

a – Etiévant, 1991; b – Meilgaard, 1975; c – Simpson, 1979.

1.3.4.2 Ácidos gordos voláteis

A constituição ácida dos mostos e dos vinhos determina alguns dos principais factores condicionantes do equilíbrio físico-químico, que caracterizam alguns dos processos evolutivos do meio (Curvelo Garcia, 1988). Condicionam a actividade dos microorganismos durante a vinificação e evolução do vinho ao longo das diferentes fases subsequentes à sua elaboração, e asseguram a protecção dos mostos e dos vinhos contra a ocorrência de eventuais perturbações. Conferem, especialmente aos vinhos brancos, uma elevada estabilidade microbiológica e físico-química e contribuem para uma melhoria da qualidade organoléptica do vinho.

A génese dos diferentes ácidos presentes nos vinhos é diversificada. Alguns são provenientes das uvas, essencialmente da polpa (tartárico, málico e cítrico), outros resultam da actividade levuriana durante a fermentação alcoólica (acético, oxalacético,

succínico, citramálico, fumárico e láctico), e outros ainda surgem de reacções químicas que ocorrem durante a evolução dos mostos e dos vinhos e das diversas formas de acção tecnológica.

A composição dos ácidos nos mostos e nos vinhos é bastante diferenciada no que se refere à sua natureza química, à força ácida, aos seus teores e à sua influência nas características organolépticas dos vinhos.

São os ácidos orgânicos fixos – tartárico, málico, cítrico, succínico e láctico, que conferem aos vinhos as suas propriedades ácidas. A natureza e as concentrações em que se encontram são importantes no estabelecimento do equilíbrio ácido-base e consequentemente nas características organolépticas do vinho. Assumem também um papel fundamental como intermediários na síntese de alguns compostos como por exemplo, os aminoácidos. Desempenham outras funções ao nível da fermentação, do desenvolvimento microbiano, das reacções redox e na combinação com o dióxido de enxofre.

Os ácidos oxálico, ascórbico, glucónico, citramálico, glicoxílico, oxalacético e α -cetoglutárico, encontram-se nos vinhos em concentrações normalmente bastante baixas, constituindo contudo factores de qualidade.

Além dos ácidos orgânicos fixos, encontram-se nos vinhos ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) cujos valores de pK levam a supor uma contribuição mínima para a acidez total. Possuem no entanto, propriedades anti-sépticas, sápidas, de adstringência e de dureza. Encontram-se nas uvas sob a forma de ésteres, hidrolisando-se durante a vinificação e conservação dos vinhos.

Alguns ácidos gordos voláteis como o propanóico, 2-metilpropanóico, 2-metilbutanóico, 3-metilbutanóico e 2-fenilacético, são formados a partir dos α -cetoácidos, enquanto que os ácidos gordos com número par de átomos de carbono, butanóico, hexanóico, octanóico e decanóico, são provenientes do metabolismo dos lípidos. Possuem odores considerados negativos, mas encontram-se nos vinhos em concentrações normalmente inferiores ao seu limiar de percepção olfactivo (Dubois, 1994; Etiévant, 1991). Nos vinhos brancos o ácido octanóico pode atingir teores próximos ou mesmo superiores ao seu limiar, 10 mg.L^{-1} (Simpson, 1979).

A tabela 1.8, apresenta os teores limites encontrados em vinhos brancos por Etiévant (1991), limiares olfactivos e alguns descritores aromáticos associados aos ácidos gordos voláteis.

Tabela 1.8 Teores, limiares de percepção olfactiva e descritores aromáticos de alguns ácidos presentes nos vinhos.

Ácidos	Teores em vinhos brancos ^a (mg.L ⁻¹)	Limiar olfactivo (mg.L ⁻¹)		Descritores aromáticos ^b
		vinho ^a	cerveja ^a	
acético	4,7-400		175	acre, vinagre
propanóico	0,1-1,7		150	acético, vinagre, lácteo
2-metilpropanóico	0,01-2,1		30	suor, amargo, avinagrado,
butanóico	0,04-1,1		2,2	amanteigado, queijo, suor
2-metilbutanóico	0,1-1,6		1,5	queijo, lúpulo velho, suor
hexanóico	0,02-5,7	8	8	ácido gordo, óleo vegetal, suor
octanóico	0,07-20,9	10	13	ácido gordo, óleo vegetal
decanóico	0-4,5	6	--	cera, cebo, ranço, sabão

^a – Etiévant, 1991; ^b – Meilgaard, 1975

As condições em que decorre a fermentação são importantes para a formação dos ácidos gordos voláteis. Condições de anaerobiose, baixa temperatura de fermentação e clarificação dos mostos, são os factores mais favoráveis à produção destes compostos (Henschke e Jiranek, 1994).

Em condições anaeróbias, os açúcares em C₆ transformam-se em ácido pirúvico, que sendo pouco abundante nos vinhos, está na origem da formação de vários produtos secundários (figura 1.21). Pode formar a acetil-CoA que por hidrólise origina o ácido acético. O ácido pirúvico por descarboxilação origina o ácido oxalacético que pode ser transformado pela levedura em ácido málico. Este pode originar o ácido succínico, tendo como intermediário o ácido fumárico que, por descarboxilação, origina o ácido propanóico. Pode igualmente obter-se o ácido succínico por condensação oxidativa de duas moléculas de acetil-CoA (Usseglio-Tomasset, 1995).

Os principais ácidos gordos de cadeia longa produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, são o ácido linoleico (C18:2), o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1), e o ácido esteárico (C18:0). Têm uma acção importante na vinificação como factor nutricional das leveduras. Incorporados nos fosfolípidos, nos triglicéridos e nos ésteres dos esteróis, são utilizados pelas leveduras em condições anaeróbias. Os de menor peso molecular, hexanóico (C6:0), octanóico (C8:0) e decanóico (C10:0), além da origem levuriana, podem formar-se pelo catabolismo dos ácidos gordos de maior cadeia. São precursores da síntese dos ésteres durante a fermentação.

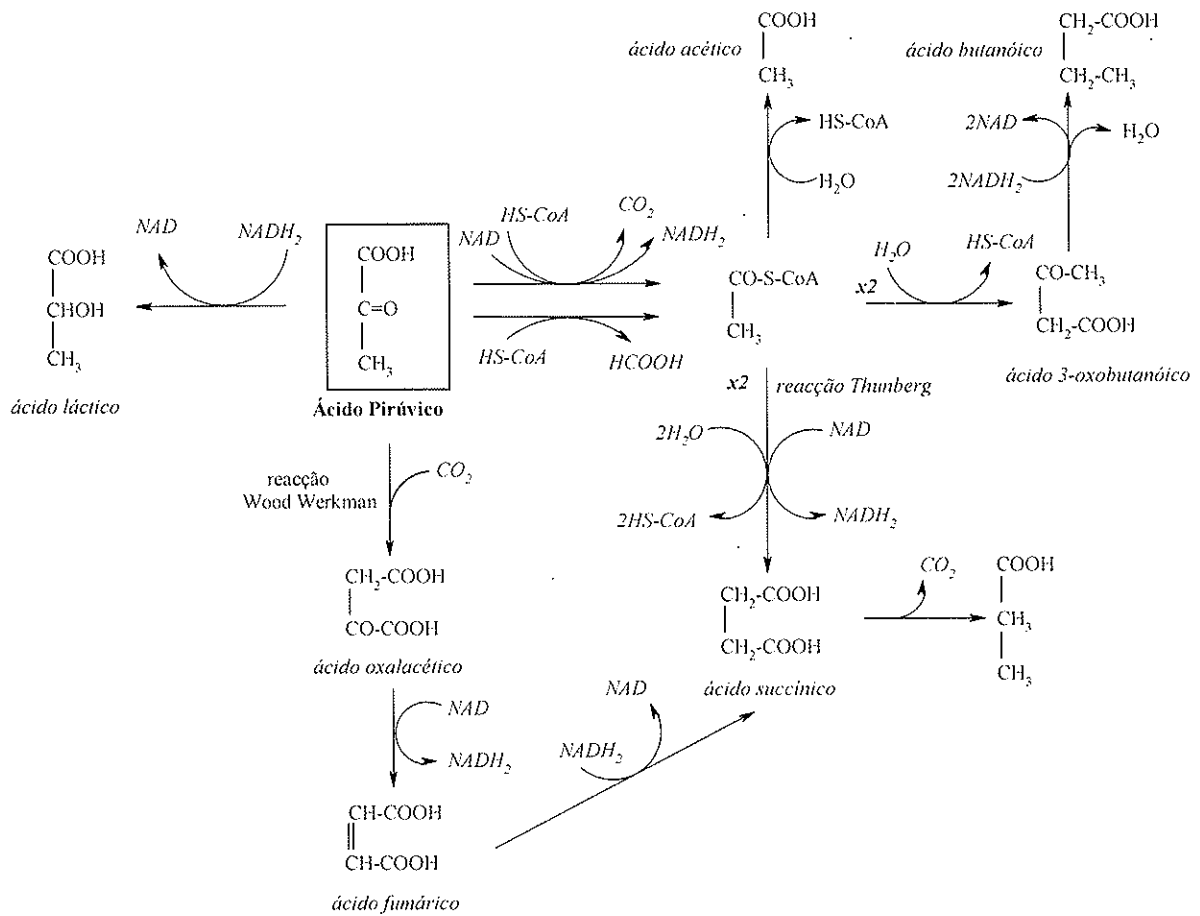


Figura 1.21 – Formação de alguns ácidos orgânicos constituintes do vinho, a partir do ácido pirúvico (adaptado de Usseglio-Tomasset, 1995).

Alguns ácidos orgânicos – acético, succínico, α -cetoglutarico, málico, cítrico, podem ter um efeito directo nas características organolépticas do vinho e contribuem para o valor de pH. Entre estes, o ácido succínico, representa um dos principais subprodutos da fermentação, podendo representar 0,3 a 0,5 % dos açúcares fermentados; intervém no metabolismo dos lípidos e no ciclo de Krebs. É um diácido com um valor de pK_a elevado, acentuando o carácter vinoso dos vinhos (Usseglio-Tomasset, 1995).

O principal ácido volátil é o ácido acético que representa, sensivelmente, 90 % da acidez volátil dos vinhos. Forma-se essencialmente durante o processo fermentativo dependendo a quantidade formada, das condições de fermentação, da presença de oxigénio, da composição dos mosto e da espécie e estirpe das leveduras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

1.3.4.3 Ésteres etílicos

Caracterizados pela sua grande diversidade, os ésteres são os constituintes maioritários da fracção volátil das bebidas alcoolizadas. Genericamente estão agrupados em três grandes classes: *acetatos de álcoois superiores*, *ésteres etílicos de ácidos gordos* e *ésteres etílicos de ácidos fixos*. Tendo em conta a importância quantitativa do etanol, nomeadamente em vinhos fortificados como o vinho Madeira, e a maior reactividade dos álcoois primários, os ésteres etílicos são, por razões cinéticas, os mais abundantes.

Juntamente com os álcoois superiores são os responsáveis pelo aroma fermentativo dos vinhos. Os acetatos dos álcoois superiores apresentam odores agradáveis conferindo aos vinhos jovens notas a “flores” (rosas – acetato de 2-feniletano) e a “fruta” (banana – acetato de isoamilo; maçã – octanoato de etilo). Os ésteres etílicos dos ácidos gordos participam na *finesse* aromática dos vinhos novos conferindo-lhes aromas agradáveis de “cera” e de “mel”.

A reacção de esterificação do ácido acético com alguns álcoois superiores (nomeadamente o 2-metilbutan-1-ol, o hexan-1-ol e o 2-feniletanol) origina os acetatos de álcoois superiores - *acetato de isoamilo*, *acetato de hexilo* e *acetato de 2-feniletano*, possuidores de odores intensos muito particulares. Participam no aroma dos vinhos neutros, podendo em alguns casos mascarar o aroma varietal.

Embora possam existir em pequenas quantidades nas uvas e nos mostos (Maarse e Visscher, 1989), são formados sobretudo durante o processo fermentativo pelo metabolismo das leveduras - esterificação enzimática entre os álcoois livres e os ácidos carboxílicos sob forma activa (acil-S-CoA) (Herraiz e Ough, 1993), e por esterificação química durante os processos de maturação e envelhecimento do vinho (Cantagrel e Carles, 1978, referenciado por Ribeiro, 2001). É por esta via que surgem lentamente no decurso do envelhecimento, os ésteres ácidos e neutros dos ácidos dicarboxílicos: succínico, tartárico, málico e fumárico, essencialmente. Estas duas vias podem intervir na síntese do mesmo composto. Em geral, a cinética de formação dos ésteres é rápida no início da fermentação, seguindo-se um crescimento lento a partir da fase tumultuosa que permanece ou diminui ligeiramente durante o período lento.

A acetil-CoA é o composto chave da biossíntese dos ésteres. A acetil-S-CoA, proveniente do ácido pirúvico, pode reagir com a malonil-S-CoA por uma reacção do tipo Claisen, originando um novo acil-S-CoA. A alcoólise dos acil-S-CoA, em ésteres etílicos de ácidos gordos, é catalisada por enzimas específicos.

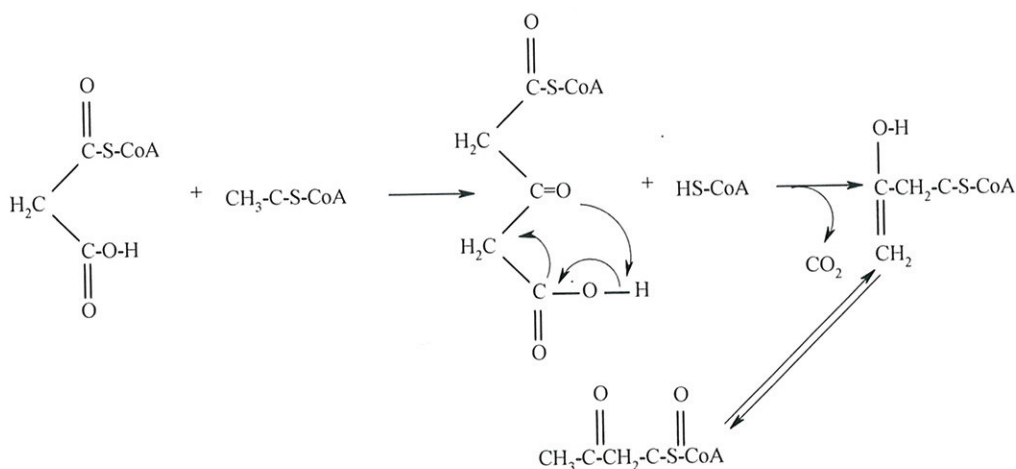


Figura 1.22 – Mecanismo de biossíntese dos ácidos gordos (adaptado de Bayonove et al., 1998).

A biogénese da acetil-CoA no decurso da fermentação, pode ocorrer por três vias de acordo com Dubois (1994a) e Nykänen (1986): por activação dos ácidos carboxílicos produzidos por oxidação dos aldeídos correspondentes por acção das leveduras; por descarboxilação oxidativa dos α -cetoácidos; e pelo anabolismo dos ácidos gordos com um número par de átomos de carbono. O catabolismo por β -oxidação intracelular dos ácidos gordos de cadeia longa fornece outra via de acesso aos acil-S-CoA, sobretudo no início da fermentação.

De acordo com Soles *et al.*, (1982), a formação dos ésteres durante a fermentação alcoólica é influenciada por vários factores entre os quais, a presença de oxigénio, a temperatura de fermentação, a espécie de levedura, a composição do meio, o pH e o teor de dióxido de enxofre.

Condições aeróbias favorecem a formação de alguns ésteres, como o hexanoato de etilo e o octanoato de etilo, enquanto que outros, como o decanoato de etilo, são produzidos em maior extensão em condições de semi-aerobiose. A presença de

oxigénio inibe a produção de ésteres pelas leveduras (Boulton *et al.*, 1998), enquanto que baixas temperaturas de fermentação favorecem a sua formação.

Bisson *et al.*, (1980), mostraram que a produção máxima de ésteres etílicos ocorre a uma temperatura de fermentação de 13 °C, apresentando os vinhos um aroma mais equilibrado quando comparados com vinhos fermentados a temperaturas superiores ou inferiores. Killian e Ough (1979), concluíram que temperaturas de fermentação inferiores a 13 °C favorecem a formação de ésteres etílicos de cadeia curta e que temperaturas superiores a 15 °C favorecem a formação de ésteres etílicos de cadeia longa. Também Bertrand (1978) verificou que a concentração dos ésteres etílicos diminui com o aumento da temperatura de fermentação.

Ramey e Ough (1980), ao estudarem a influência da temperatura, do pH e do teor de etanol na hidrólise dos ésteres, verificaram que a cinética de hidrólise é maior a temperaturas elevadas e a baixos valores de pH, não sendo dependente do teor de etanol. Verificaram também, que os acetatos de álcoois superiores hidrolisam-se mais rapidamente do que os ésteres etílicos dos ácidos gordos. Para os ésteres etílicos dos ácidos gordos, a cinética de hidrólise varia proporcionalmente com o peso molecular, o que explica a hidrólise mais rápida dos ésteres pesados.

O teor em ésteres totais é determinado pela composição e pela idade do vinho, sendo os ésteres neutros formados sobretudo por via biológica, pouco aumentando por acção das reacções de esterificação durante o envelhecimento, as quais originam sobretudo ésteres ácidos a partir de poliacidos (Curvelo Garcia, 1988).

Os ésteres neutros presentes em maiores quantidades nos vinhos são o acetato de etilo, o lactato de etilo e o succinato de dietilo. Estes três ésteres são também os mais importantes dos vinhos do Porto de diferentes idades e origens (Silva Ferreira, 1998; Curvelo Garcia, 1988). Os mesmos autores realçaram a importância que o succinato de dietilo parece assumir nos vinhos do Porto – o seu teor aumenta com a idade do vinho de uma forma proporcional e característica (Silva Ferreira, 1998).

Dos ésteres, o acetato de etilo é, quantitativamente, o éster mais importante dos vinhos. Apesar de uma pequena quantidade se formar durante a fermentação alcoólica, a maior parte é proveniente da intervenção de bactérias acéticas em condições aeróbias durante a conservação do vinho. É responsável por características olfactivas marcadas

por um odor “acre” e “sufocante”. Com um limiar de percepção olfactiva nos vinhos da ordem dos 160 mg.L⁻¹, participa da complexidade aromática favorável à qualidade do vinho entre os 50 e 80 mg.L⁻¹, contrariamente ao sabor a “queimado” quando presente em teores relativamente elevados (> 120 mg.L⁻¹) (Dubois, 1994a).

Organolepticamente, os acetatos dos álcoois superiores e os ésteres etílicos dos ácidos gordos conferem aos vinhos odores agradáveis a fruta e a flores, com excepção do acetato de etilo cujo odor é considerado negativo, para valores superiores a 100 mg.L⁻¹ (Bayonove *et al.*, 1998).

Na tabela 1.9, apresentam-se os limiares de diferença e os descritores aromáticos de alguns ésteres do vinho.

Tabela 1.9 Teores de alguns ésteres presentes no vinho, respectivos limiares de diferença olfactiva e descritores aromáticos.

Ésteres	Teores em vinhos brancos ^a (mg.L ⁻¹)	Limiares de diferença (mg.L ⁻¹)		Descritores aromáticos ^b
		vinho ^a	cerveja ^b	
<i>ésteres etílicos de ácidos gordos</i>				
lactato de etilo	0,17-378	150	250	morango, framboesa
butirato de etilo	0,01-1,2	—	0,40	papaia, manteiga, adocicado, maçã
hexanoato de etilo	0,03-1,3	0,08	0,23	maçã, frutado, adocicado, anis
octanoato de etilo	0,05-2,3	0,58	0,90	maçã, frutado, adocicado
decanoato de etilo	0-2,1	0,51	1,50	ácidos gordos, frutado, maçã.
<i>acetatos de álcoois superiores</i>				
acetato de etilo	0,15-150	12,2	33	solvente, frutado, cola
acetato de isoamilo	0,03-0,5	0,16; 1,00	1,60	banana, maçã, solvente
acetato de isobutilo	0,03-0,16	—	1,60	banana, doce, frutado
acetato de hexilo	0-3,6	0,67; 2,40	3,50	adocicado, aromático
acetato de 2-feniletilo	0-18,5	1,80	3,80	rosas, mel, maçã, adocicado

a – Etiévant, 1991; b – Meilgaard, 1975

Os ésteres etílicos de cadeia curta, os mais importante para a qualidade do aroma, conferem tipicamente aromas frutados e florais, apresentando aroma a “maçã”, a “papaia”, a “morango”, a “banana” e a “ananás”, enquanto que os de cadeia mais longa são caracterizados por possuírem aroma a “sabão” e a “ranço” (Simpson, 1979; Meilgaard, 1975).

Os ésteres etílicos em C₄, C₆, C₈ e C₁₀, desempenham um papel importante no aroma dos vinhos jovens, nomeadamente o hexanoato de etilo cujo limiar de diferença é, muitas vezes, inferior aos teores encontrados. Devido à semelhança de odores podem ocorrer efeitos sinérgicos (Dubois, 1994a), pelo que, mesmo presentes em quantidades inferiores ao limiar olfactivo, podem contribuir para o aroma global do vinho.

1.3.4.4 Compostos carbonilados

Poucos são os aldeídos cuja existência é conhecida nas uvas. Foram no entanto identificados os compostos em C₆, hexanal e (*E*)-hex-2-enal, que conferem odores “vegetais” e “herbáceos”.

Muitos dos compostos carbonilados existentes nos vinhos são formados pelas leveduras por descarboxilação dos ácidos α -cetónicos correspondentes (Baro e Quiros, 1977). Estão presentes no vinho em concentrações relativamente baixas, devido à forte actividade redutora por parte da levedura, durante a fermentação alcoólica, e à presença de SO₂ e álcoois. Os susceptíveis de influenciar o aroma do vinho são o acetaldeído, a acetoína, o diacetilo, a 3-hidroxipentan-2-ona, a pentan-2,3-diona, o piruvaldeído, o acetol e o fenilacetaldeído (Bayonove *et al.*, 1998). De salientar ainda a presença nos vinhos de acetais e lactonas furânicas e pirânicas.

De entre os muitos aldeídos encontrados nos vinhos, o acetaldeído constitui, em média, 90 % de todos eles. Forma-se durante a fermentação alcoólica por descarboxilação do piruvato, graças à acção da *piruvato descarboxilase* (Lehninger, 1970). A produção de acetaldeído depende fortemente das condições físico-químicas da fermentação e do tipo de levedura (Strydom, 1985). Em concentrações elevadas, exerce um efeito desfavorável no aroma dos vinhos conferindo-lhes um odor a “manteiga”. Pode atingir valores da ordem das dezenas de mg.L⁻¹ ao fim de alguns anos de envelhecimento. Nos vinhos oxidados os teores são mais elevados relativamente aos que não sofrem este processo químico. As suas múltiplas origens, a sua grande facilidade de reacção, a possibilidade de combinação com o dióxido de enxofre (SO₂) e as suas propriedades organolépticas, conferem grande importância a este composto.

Facilita a copolimerização dos compostos fenólicos (antocianinas e catequinas) induzindo uma evolução da cor dos vinhos tintos no decurso da sua conservação.

Os compostos carbonilados alifáticos actuam como intermediários na formação dos álcoois superiores a partir dos aminoácidos e açúcares. São intermediários na biossíntese dos aminoácidos ramificados a partir do metabolismo dos açúcares (Henschke e Jiranek, 1994).

Encontram-se também nos vinhos aldeídos da série aromática, em particular a vanilina, associada à conservação em cascos de madeira. Confere aos vinhos um pronunciado aroma a “baunilha”.

É conhecida também a presença de moléculas com vários grupos aldeído ou cetona, casos do glioxal, metilglioxal e diacetilo. Estes compostos α -dicarbonilados foram identificados, além do vinho, em vários outros alimentos como o iogurte, café e cerveja (Yamaguchi *et al.*, 1994; Revel e Bertrand, 1993). Os descritores aromáticos que lhes são associados são “leite azedo, acre” para o glioxal, “queimado, adstringente” para o metilglioxal (Moll e Moll, 1990) e “manteiga, gordura” para o diacetilo. Este composto com um LPO de 4 mg.L^{-1} em vinhos brancos e de 12 mg.L^{-1} em vinhos tintos (Bertrand *et al.*, 1984), pode contribuir para o aroma de certos vinhos.

Suomalainen e Ronkainen (1968), mostraram que o diacetilo (2) é sintetizado pela *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica por descarboxilação oxidativa do α -acetolactato (1), podendo ser reduzido a butano-2,3-diol (4) via acetoína (3) (figura 1.23).

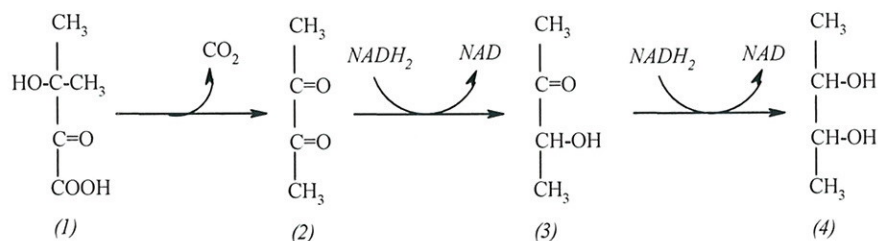


Figura 1.23 – Síntese do diacetilo a partir do α -cetolactato (adaptado de Usseglio-Tomasset, 1995).

O glioxal e o metilglioxal podem ter a mesma origem bioquímica (Murata *et al.*, 1985). O metilglioxal pode igualmente formar-se a partir do D,L-gliceraldeído e da

dihidroxicetona (Ridlle e Lorenz, 1968) ou gliceraldeído-3-fosfato (Pennickx *et al.*, 1983).

Estes compostos α -dicarbonilados podem actuar como substratos em diversas reacções químicas, nomeadamente na degradação de Strecker, onde intervêm como precursores juntamente com os aminoácidos, conduzindo à formação de outros compostos carbonilados e alquilpirazinas, e em reacções de condensação aldólica (Moll e Moll, 1990). Os trabalhos recentes de Castagnino *et al.*, (1997), mostram que nos vinhos tintos, o diacetilo pode combinar-se com as antocianidinas, como a malvidina, mobilizando assim no decurso do tempo uma parte deste composto.

A estirpe de levedura, a temperatura de fermentação, o arejamento e o teor de SO_2 , são factores com influência na produção dos compostos carbonilados (Henschke e Jiranek, 1994).

1.3.4.4.1 Lactonas

A lactonas são formadas por esterificação intramolecular entre uma função ácida (hidroxiácidos) e um grupo hidroxil na posição 4 (γ -lactonas) ou 5 (δ -lactonas) pertencentes à mesma molécula, originando um heterociclo oxigenado. De acordo com Tang e Jennings (1968), nos frutos estes hidroxiácidos formam-se por hidratação dos ácidos gordos insaturados na posição 4 seguida de ciclização favorecida pelo pH dos tecidos vegetais.

Existem também as lactonas voláteis de origem fermentativa, susceptíveis de participar no aroma dos vinhos. A mais abundante é a γ -butirolactona caracterizada por notas aromáticas pouco intensas a “manteiga“. No entanto, o seu elevado LPO, 20 mg.L^{-1} de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.*, (2000), faz com que não participe no carácter aromático dos vinhos. É formada por lactonização do ácido γ -hidroxibutírico, proveniente do ácido glutâmico por desaminação e descarboxilação, de acordo com o mecanismo de Ehrlich. As lactonas podem também ser provenientes da uvas.

A figura 1.24 representa um possível mecanismo de formação da γ -butirolactona.

Nos vinhos foram identificadas algumas 5-alkil- δ -lactonas (δ -C₅, C₈ a C₁₀, C₁₂) com teores da ordem de alguns $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Etiévant, 1991; Baumes *et al.*, 1986; Etiévant *et al.*, 1983).

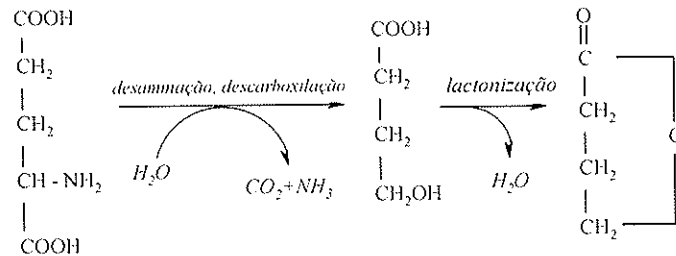


Figura 1.24 - Possível via de formação da γ -butirolactona (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

As mais abundantes são as γ -lactonas, que de acordo com a sua origem podem ser agrupadas em γ -butirolactonas e 4-alkil- γ -lactonas (Etiévant, 1991; Müller *et al.*, 1973). As primeiras podem ser substituídas ou não na posição 4 por grupos alcoxi (etoxi- e isopentiloxi-), por grupos acetilo e 1-hidroxieltilo e pelo grupo carboetoxi. Das segundas, (γ -C₅ a C₁₀ e C₁₂), fazem parte a 2-hidroxi-3,3-dimetil- γ -butirolactona (pantolactona) e a 2-hidroxi-3-metil-2-penteno- γ -lactona (sotolon). Todas são consideradas de origem fermentativa com exceção do sotolon.

A propriedades sensoriais das lactonas saturadas variam em função da cadeia. Apresentam desde notas “herbáceas” caso da 4-pentanolactona a notas a “caramelo” caso da 4-hexanolactona. As notas a “aniz” e “alcaçuz” são associadas à 4-nonolactona enquanto que as notas a “pêssego” à 4-decanolactona. Os aromas da 5-decanolactona e da 5-dodecanolactona são descritos, respectivamente, como “coco” e “ameixa”.

Os limiares de percepção na água são de algumas centenas de $\mu\text{g.L}^{-1}$ para as lactonas γ -C₅, γ -C₆ e γ -C₁₀. Diminuem para algumas dezenas de $\mu\text{g.L}^{-1}$ para as lactonas γ -C₁₀ e γ -C₁₂ (Engel *et al.*, 1989).

Com exceção da γ -nonalactona, nos vinhos de algumas castas, e do sotolon, nenhum dos compostos pertencente a esta família de heterociclos apresenta um valor

de índice aromático (I)¹ superior à unidade, pelo que a influência sobre o aroma dos vinhos parece ser pequena.

1.3.4.5 Compostos azotados

Os constituintes azotados dos mostos e dos vinhos apresentam uma grande importância na vinificação, na conservação e na estabilização dos vinhos. São essenciais ao crescimento e metabolismo das leveduras, e interferem significativamente nas suas características organolépticas (Curvelo Garcia, 1988).

No estado mineral encontram-se na forma do catião amónio (NH_4^+). É contudo na fracção orgânica que reside a sua importância. Esta fracção compreende fundamentalmente, os aminoácidos livres, as proteínas e os polipeptídeos, os mais importantes quantitativamente, e em quantidades vestigiárias as aminas biogénicas, os nucleósidos e as hexosaminas (Alves, 1992).

Os compostos azotados dos vinhos provêm essencialmente das uvas sendo sintetizados durante a maturação. O azoto amoniacal, obtido a partir dos nitratos do solo, constitui uma fracção importante do azoto total na uva verde. A fracção do azoto aminado é bastante inferior à fracção do azoto amoniacal no início da maturação, aumentando durante a maturação devido à síntese de aminoácidos (Alves, 1992).

Os aminoácidos constituem um grupo de compostos não voláteis presentes nos vinhos em teores relativamente elevados (mg.L^{-1}). Provêm directamente do metabolismo das plantas ou do processo fermentativo. A sua degradação, quer através da reacção de Maillard quer pela reacção de Strecker, é responsável por um grande número de compostos que contribuem para o aroma dos vinhos.

O teor dos diversos aminoácidos presentes nas uvas depende de diferenciados factores quer culturais, como a casta (Spayd e Anderson-Bagge, 1996), as condições climáticas do ano, a natureza e constituição do solo, o estado de maturação da uva (Hernández-Orte *et al.*, 1999) e o nível de fertilização azotada (Bell *et al.*, 1979), quer factores tecnológicos (Bisson e Butzke, 2000). A sua inegável importância reside no facto de actuarem como fonte de azoto para as leveduras durante a fermentação alcoólica, como nutrientes para as bactérias durante a fermentação maloláctica e como

¹ Índice aromático, I =concentração do composto/limiar de percepção olfactivo

precursores dos compostos secundários responsáveis pelo “*bouquet*” dos vinhos – álcoois superiores, aldeídos e ácidos gordos (Lhuguenot *et al.*, 1979, referenciado por Alves 1992). Têm sido utilizados na caracterização e diferenciação de vinhos, no que respeita à sua tipicidade e genuinidade (Ribeiro, 1996) podendo ser úteis no controlo de qualidade e na defesa das denominações de origem.

Do ponto de vista tecnológico e produtivo, os teores de aminoácidos livres nos mostos são importantes, já que são um dos factores que influenciam as paragens e amuos de fermentação (Ribeiro, 2001). Os vinhos tintos são mais ricos em compostos azotados que os vinhos brancos.

Relativamente a outro grupo de compostos azotados, as aminas biogénicas, podem formar-se durante a fermentação por descarboxilação de aminoácidos livres, por acção de descarboxilases (Cerruti *et al.*, 1978). Assim, das aminas aromáticas e heterocíclicas, a histamina tem como precursor a histidina, a tiramina tem como precursor a tirosina, a β -feniletilamina a fenilalanina e a triptamina o triptofano. Das di-, tri- e poliaminas alifáticas, a putrescina tem como precursor a arginina e ornitina, a cadaverina tem como precursor a lisina e a agmatina a arginina.

Apesar de não exercerem qualquer influência sobre o aroma do vinho, já que ao pH enológico encontram-se protonadas e portanto não são voláteis, a sua presença nos vinhos tem merecido a atenção de investigadores e enólogos, devido aos efeitos nefastos que podem causar (Bauza *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1987).

Ough (1984) refere um mecanismo conducente à formação de pequenas quantidades das aminas sem intervenção microbiana, por descarboxilação dos aminoácidos na presença de glioxal a temperaturas moderadas.

Drob e Wittkoswski (1993), referem que as bactérias lácticas, originam um aumento dos teores de aminas biogénicas, nomeadamente da tiramina e da histamina durante a fermentação maloláctica.

As aminas primárias presentes no mosto são acetiladas pela levedura em acetamidas. Alguns investigadores (Webb *et al.*, 1966) defendem uma origem bioquímica para estas substâncias ao longo da fermentação - reacção entre a acetil-CoA e o aminoácido correspondente com descarboxilação. A reacção entre o ácido acético, activado sob a forma de acetil-CoA ou acetil fosfato, com a amina correspondente e não com o aminoácido, é a via bioquímica proposta por Webb *et al.*, (1966) para a formação das acetamidas. As mais abundantes são a N-(2 e 3-metilbutil)acetamida, a

N-(2-feniletil)acetamida, a N-(3-metiltiopropil)acetamida, a N-fenilacetamida e a N-etilacetamida (Dubois, 1994a). O impacto olfactivo destes compostos parece ser nulo (Etiévant, 1991) apesar das primeiras se encontrarem em teores superiores a 1 mg.L^{-1} .

1.3.4.6 Compostos sulfurados

O enxofre está presente em diversas vitaminas essenciais, coenzimas e aminoácidos como a metionina e cisteína (Richmond, 1973, referenciado por Henschke e Jiranek, 1994). Os grupos tiol desempenham funções importantes nos sítios activos de várias enzimas, no transporte de electrões e no processo de crescimento e divisão celular.

As substâncias que contêm enxofre são formadas durante a maturação das uvas e, posteriormente durante o processo de fabrico do vinho. São produzidos enzimaticamente nas uvas como consequência do metabolismo das leveduras (Schreier e Drawert, 1976). Podem formar-se por via não enzimática por influência da temperatura, da luz, de transformações químicas como as reacções de Maillard ou degradação de Strecker, das técnicas de vinificação e da hidrólise ou degradação química de pesticidas.

Recentemente, a composição dos compostos sulfurados nos vinhos tem sido objecto de vários estudos no que concerne à sua identificação e origem, assim como, ao carácter e impacto na qualidade do vinho (Silva Ferreira *et al.*, 2003a).

De acordo com a sua estrutura química, estes compostos podem classificar-se em 5 grupos: *os tióis* (R-SH) muito oxidáveis convertendo-se rapidamente em dissulfuretos na presença de oxigénio, *os monossulfuretos* (R-S-R), *os polissulfuretos* (R-SS-R), *os tioésteres* e *os compostos heterocíclicos* (Mestres *et al.*, 2000).

A sua importância nas características organolépticas dos vinhos está associada à sua elevada volatilidade e reactividade e aos baixos LPO que apresentam, nomeadamente os de baixo peso molecular (Shutte, 1975).

Na tabela 1.10 estão registados os limiares olfactivos e os descritores aromáticos de alguns compostos sulfurados mais importantes encontrados nos vinhos.

Tabela 1.10 Limiares de percepção olfactiva e descritores aromáticos de alguns compostos sulfurados em diferentes matrizes^{a, b, c}.

Compostos sulfurados	Limiares olfactivos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Descritores aromáticos
	vinho	água	
<i>baixo peso molecular (p.e.<90°C)</i>			
sulfureto de dietilo	0,91-18	--	vegetais cozidos, cebola, alho
sulfureto de hidrogénio	0,1-150	5-10	ovos podres
sulfureto de dimetilo	10-160	0,3-10	cereais, melaço, marmelo, trufa
dissulfureto de dietilo	4,3	--	alho, borracha
sulfureto de carbono	38		etéreo
metanotiol	0,3	0,02-2	água estagnada
etanotiol	1,1	8	cebola
<i>alto peso molecular (p.e.>90°C)</i>			
dissulfureto de dimetilo	20-45	0,06-30	couve cozida, cebola
2-mercaptoetanol	130-1000	--	borracha queimada, aviário
2-metiltio-etanol	250	--	couve-flor, feijão verde
metionato de etilo	300	--	"metálico"
acetato de metionilo	50-115	--	cogumelos
metionol	1200-4500	1500	batatas cozidas, couve cozida
4-metiltio-butan-1-ol	100	--	terroso, alho, cebolinho
benzotiazol	50-350	--	borracha

a - Darriet *et al.*, 1991; b - Etiévant, 1991; c - Mestres *et al.*, 2000

Alguns destes compostos, principalmente os que possuem função tiol, participam positivamente no aroma varietal de diferentes variedades (exemplo da 4-metil-4-mercaptopentano-2-ona no aroma do *Sauvignon*). Mas geralmente, os derivados sulfurados comunicam aos vinhos odores intensos e desagradáveis. Com o aumento do peso molecular a intensidade odorífera diminui. Podemos deste modo classificar estes compostos em dois grupos consoante a sua volatilidade (Mestres *et al.*, 2000): *compostos sulfurados de baixo peso molecular* (ponto de ebulição inferior a 90°C) e *compostos moleculares de peso molecular elevado* (ponto de ebulição superior a 90°C).

Entre os compostos sulfurados do primeiro grupo, identificados e doseados nos vinhos, os mercaptanos (sulfureto de hidrogénio, metanotiol e etanotiol), quando presentes em concentrações superiores aos limiares de percepção olfactiva, têm um forte impacto negativo no aroma do vinho. O sulfureto de hidrogénio e o metanotiol, provêm do metabolismo das leveduras. O primeiro é produzido no decurso da fermentação alcoólica sendo regulado pelas enzimas responsáveis pela redução dos

sulfatos e pela biossíntese de certos aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina). O segundo é sintetizado pelas leveduras a partir da metionina (De Mora *et al.*, 1986). A produção de sulfureto de hidrogénio é essencial à levedura pois permite a síntese de compostos sulfurados (tiamina, cisteína e metionina via homocisteína) necessários ao seu crescimento e à sua actividade metabólica.

O metilmercaptano, outro derivado sulfurado de baixo peso molecular, pode ser formado por β -eliminação a partir do metional formado pela levedura (Henschke e Jiranek, 1994).

Todavia, existem compostos pertencentes a este grupo, como o sulfureto de dimetilo (DMS), que contribuem positivamente para o “*bouquet*” dos vinhos (De Mora *et al.*, 1987). Alguns investigadores descrevem o DMS como sendo responsável por odores a “cereais”, “melaço”, e “espargos” enquanto que outros lhe associam odores a “marmelo” ou “trufa”. Outros ainda (Silva Ferreira *et al.*, 2003) atribuem-lhe um carácter “frutado”, quando a concentração atinge o LPO.

Não obstante os vários estudos envolvendo o DMS, a sua origem e influência no aroma global do vinho, não estão definidas (De Mora *et al.*, 1986). Na cerveja a sua origem está associada ao precursor, S-metilmetionina (De Mora *et al.*, 1986), no entanto este composto não foi detectado nos mostos. Os estudos de Anness e Bamforth, (1981) mostram que as leveduras podem produzir DMS a partir do dimetilsulfóxido (DMSO) pela actividade da DMSO reductase.

Devido à sua elevada reactividade (oxi-redução, dismutação, esterificação-hidrólise, substituição), estes compostos evoluem no decurso do envelhecimento participando no “*bouquet*” do vinho.

Entre os compostos sulfurados de peso molecular elevado (p.e.>90°C), os mais abundantes são os produtos secundários do metabolismo da cisteína, da metionina e da homometionina (Marchand *et al.*, 2000; Anocibar e Bertrand, 1995; Schreier, 1979): o 3-metiltio-propan-1-ol (metionol) e o seu acetato, o 2-mercaptoetanol, o 2-metiltio-etanol, o 3-metiltio-propanal (metional), o ácido 3-metiltio-propanóico e ésteres correspondentes, e o 4-metiltio-butan-1-ol.

Destes, o mais importante é o metionol. É formado pela levedura a partir da metionina que sofre uma desaminação seguida de descarboxilação (mecanismo d’Ehrlich), sendo o aldeído formado (metional), reduzido enzimaticamente ao álcool

correspondente (figura 1.25). Pode também formar-se a partir da metionina e do metilglioal através da reacção de Strecker.

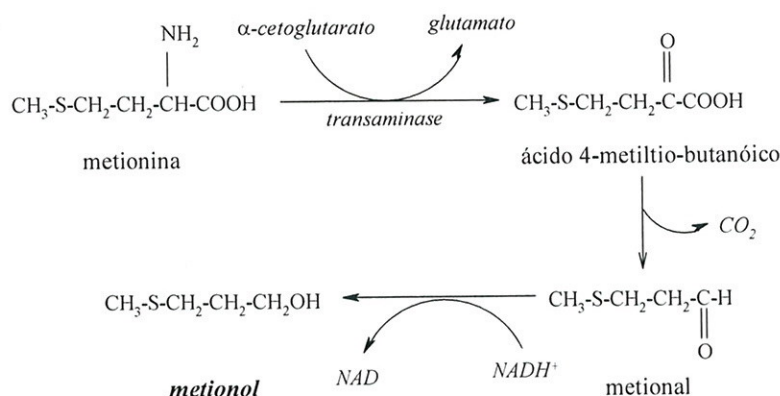


Figura 1.25 – Mecanismo de formação do metionol a partir da metionina (adaptado de Henschke e Jiranek, 1994).

Outro composto sulfurado de realce é o 2-mercaptoetanol. De acordo com Rapp *et al.*, (1985), este composto forma-se por desaminação oxidativa das cisteína, sendo a reacção favorecida a valores de pH elevado.

Muitos dos compostos sulfurados menos voláteis, encontram-se nos vinhos em concentrações inferiores ao seu LPO, casos do 2-mercaptoetanol (odor a aviário), da 2-metiltetra-hidrotiofen-3-ona (odor a metálico, gás natural), do 2-metiltio-etanol (odor a feijão verde), do 3-metiltio-propanoato de etilo (odor a metálico ou enxofre), do 3-metiltio-acetato de propilo (odor a batatas cozidas) e do 4-metiltio-butan-1-ol (odor a cebolinho, alho) (Radler, 1993).

Os teores da grande maioria dos compostos deste grupo, e contrariamente aos compostos sulfurados de baixo peso molecular, permanecem estáveis no decurso da conservação. Não atingem os seus limiares de percepção, com excepção para o 3-metiltio-propan-1-ol e para a N-(3-metiltiopropil)acetamida.

1.3.4.7 Fenóis voláteis

Presentes nos mostos em quantidades vestigiais, os fenóis voláteis estão presentes nos vinhos em concentrações que vão das dezenas a algumas centenas de

$\mu\text{g.L}^{-1}$ (Dubois, 1983; Chatonnet e Boidron, 1988, referenciado por Alves, 2000). Os mais abundantes são o 4-vinilfenol, o 4-vinilguaiacol, o 4-etilfenol e o 4-vinilfenol. São responsáveis por odores considerados negativos. Os mais desagradáveis são os odores a “farmácia” e a “guache” conferido pelo 4-vinilfenol, e a “estábulo” e “suor de cavalo” conferido pelo 4-etilfenol. Os guaiacóis transmitem odores menos desagradáveis a “cravo-da-índia” (4-vinilguaiacol) e a “fumo” e “especiarias” (4-etilguaiacol).

Dos quatro fenóis, o 4-etilguaiacol é o que apresenta um LPO mais baixo, $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ em vinhos brancos, contrariamente aos $1100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o 4-etilfenol. Para o 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol os LPO são $440 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $770 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Os vinilfenóis são formados pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por descarboxilação enzimática de dois ácidos cinâmicos do mosto, os ácidos *p*-coumárico e ferúlico, originando o vinilfenol e o vinilguaiacol, respectivamente, por acção da cinamato descarboxilase endocelular (Chatonnet *et al.*, 1993).

A reacção bioquímica que exemplifica a formação dos vinilfenóis é mostrada na figura 1.26.

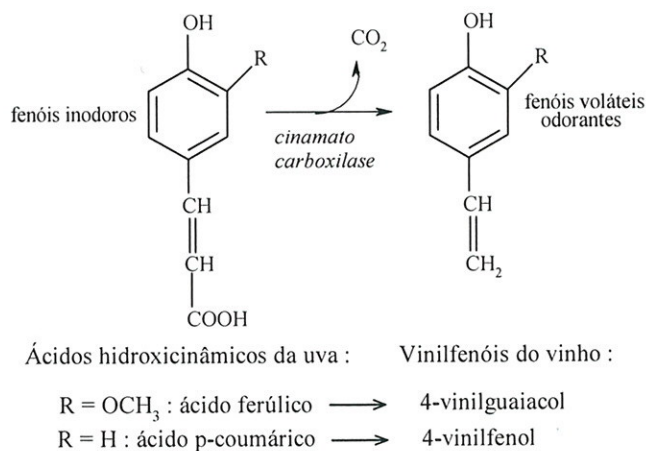


Figura 1.26 Mecanismo biossintético de formação dos vinilfenóis a partir dos ácidos cinâmicos (adaptado de Gramatica *et al.*, 1978).

Vários são os parâmetros de vinificação com influência nos teores dos vinilfenóis dos vinhos. Os ácidos fenólicos do mosto e por conseguinte os vinilfenóis, dependem das condições de extracção do mosto e da sua clarificação. Os tratamentos mecânicos violentos das uvas, as lavagens insuficientes e a maceração pelicular,

favorecem a extracção de ácidos fenólicos das partes sólidas da uva e por conseguinte a formação de vinilfenóis durante a fermentação alcoólica.

As condições de oxidação dos mostos também influenciam os teores em ácidos fenólicos. Assim a ausência de sulfitagem dos mostos ou a hiperoxigenação conduzem a uma nítida diminuição dos teores de ácido *p*-coumárico dos vinhos. A utilização de determinadas enzimas para facilitar a extracção ou clarificação de mostos de uvas brancas, pode conduzir a um aumento do teor de vinilfenóis nos vinhos e por consequência a uma depreciação da qualidade aromática. A espécie de levedura desempenha um papel essencial no teor de fenóis voláteis nos vinhos brancos (Henschke e Jiranek, 1994).

Nos vinhos, de um modo geral, o teor de 4-vinilfenol predomina sobre o de 4-vinilguaiacol (Marais e Rapp, 1988). As quantidades de fenóis voláteis produzidos pela levedura, são geralmente muito mais elevados em vinhos brancos do que em vinhos tintos. Os teores relativamente baixos de vinilfenóis nos vinhos tintos deve-se à inibição da actividade cinamato descarboxilase da *Saccharomyces cerevisiae* por compostos polifenólicos da uva (Chatonnet *et al.*, 1993).

Os etilfenóis são sintetizados pela *Brettanomyces* por acção sequencial de duas enzimas: a *cinamato descarboxilase* da levedura descarboxila os ácidos cinâmicos em vinilfenóis, seguida de redução dos vinilfenóis nos etilfenóis correspondentes catalisada pela *vinilfenol reductase* (figura 1.27).

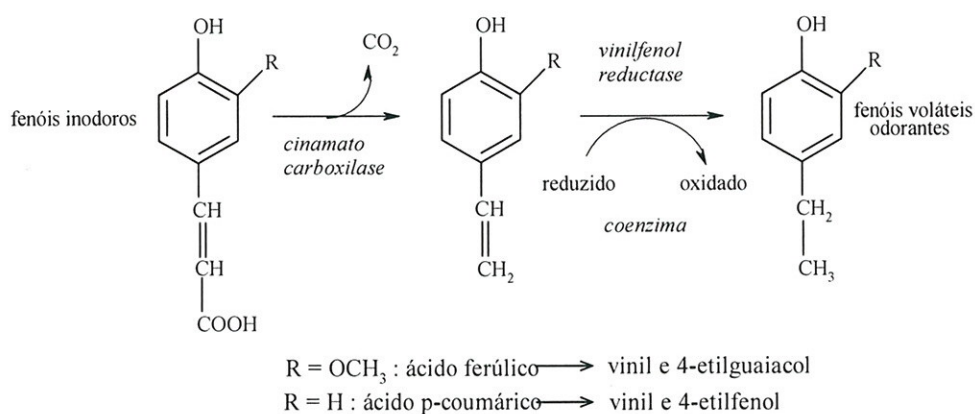


Figura 1.27 Mecanismo enzimático da produção de etilfenóis pela *Brettanomyces* (adaptado de Chatonnet *et al.*, 1992).

Etiévant *et al.*, (1989), constataram que os vinhos sujeitos a maceração carbónica apresentavam teores de etilfenóis mais elevados comparativamente aos que não sofriam este processo. Baumes *et al.*, (1988) verificaram a existência de 4-vinilfenol nas uvas de determinadas variedades, notando a sua ausência nos vinhos correspondentes e a presença do 4-etilfenol, do 4-etilguaiacol e do 4-vinilguaiacol, sugerindo que durante a fermentação alcoólica o 4-vinilfenol terá sido reduzido a 4-etilfenol.

Os compostos fenólicos são os responsáveis pelas diferenças entre os vinhos tintos e brancos, em especial pela cor e sabor dos vinhos tintos. Possuem propriedades bactericidas, antioxidantes, vitamínicas e parecem exercer uma função protectora das doenças cardio-vasculares.

1.3.5 Aromas terciários ou "*bouquet*"

Após a fase fermentativa e durante o período de maturação do vinho, o aroma continua a sofrer alterações perdendo-se parte das notas típicas varietais e da fermentação, adquirindo uma evolução com maior ou menor complexidade. A extensão dessas alterações depende sobretudo do tempo e da temperatura de armazenamento. Às transformações resultantes das oxidações e reduções ocorridas durante o período de armazenamento e envelhecimento, juntam-se outras alterações provocadas pelos sucessivos processos de tratamento a que o vinho é submetido. O vinho perde progressivamente as notas frutadas, típicas dos vinhos jovens, evoluindo para um "*bouquet*" mais complexo. Determinados vinhos adquirem a sua tipicidade aromática após vários anos de envelhecimento, enquanto que outros não suportam longos períodos de conservação.

1.4 FRACÇÃO LIVRE E LIGADA DA COMPONENTE AROMÁTICA

Na uvas e nos vinhos, as substâncias responsáveis pelo aroma estão presentes quer na forma de compostos voláteis, livres e odorantes, quer na forma de compostos

ligados, não voláteis e não odorantes designados de precursores (Cordonnier e Bayonove, 1974). A fracção ligada constitui uma espécie de reservatório aromático formada por diversos compostos voláteis (agliconas), ligados a uma ou duas moléculas de açúcar (diglicósido) ligadas entre si (Le Chevanton, 1993).

As agliconas podem ser monoterpénos, polióis terpénicos, carotenóides, álcoois lineares ou cíclicos, compostos fenólicos, fenóis voláteis e ácidos gordos (Bayonove, 1993; Strauss *et al.*, 1987; Günata, 1984).

A hidrólise por via enzimática (Günata *et al.*, 1998) e por via ácida (Williams *et al.*, 1981), têm sido propostos como possíveis métodos para a hidrólise dos glicósidos (figura 1.28).

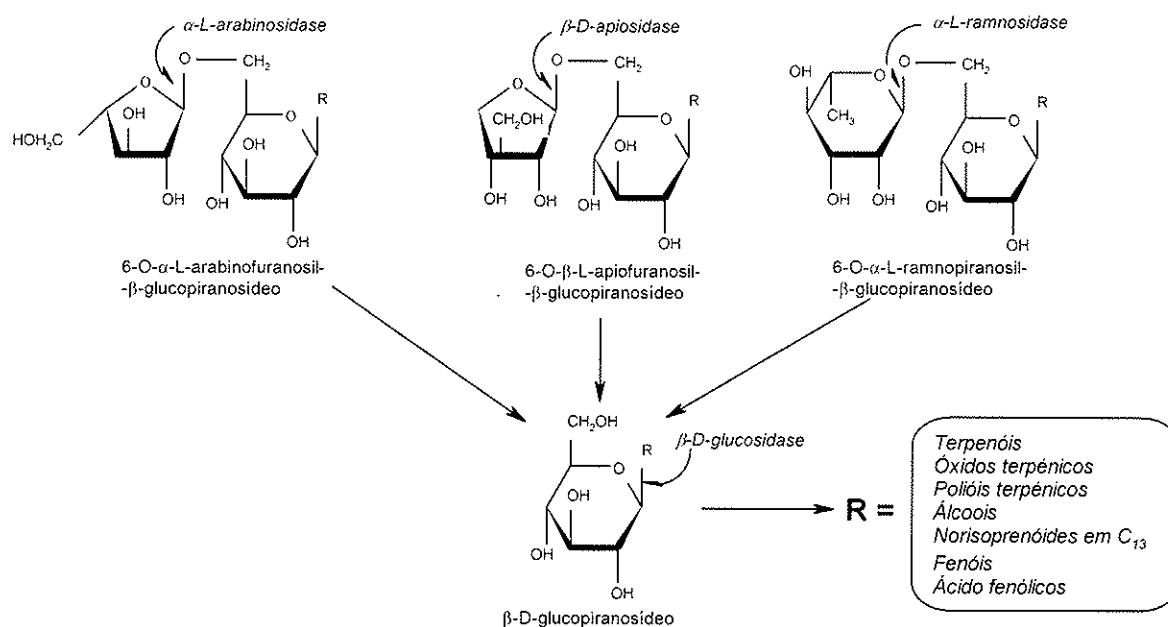


Figura 1.28 – Diferentes formas de glicósidos e algumas agliconas encontradas na uva. Mecanismo de hidrólise enzimática dos precursores (adaptado de Bayonove, 1992).

Williams *et al.*, (1982), identificaram alguns dos principais diglicósidos: 6-0- α -L-arabinosil- β -D-glucopiranosídeo, o 6-0- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosídeo e o 6-0- α -D-apiofuranosil- β -D-glucopiranosídeo. Mais recentemente Watanabe *et al.*, 1997, identificaram um α -D-glucopiranosídeo do 2-feniletanol em vinhos *Riesling*. Em

qualquer dos casos a aglicona está sempre ligada ao dissacárido por intermédio de uma glucopirranose (Bayonove *et al.*, 1992).

Vários estudos têm demonstrado que a hidrólise destes metabolitos secundários e a consequente libertação das agliconas odoríferas, pode contribuir para uma melhoria da complexidade e da intensidade das características organolépticas do vinho.

A hidrólise por via enzimática (figura 1.26) (Günata *et al.*, 1985) e por via ácida (Williams *et al.*, 1981), têm sido propostos como possíveis métodos para a hidrólise dos glicósidos.

A hidrólise enzimática processa-se em duas etapas (Dupin *et al.*, 1992). Na primeira ocorre a ruptura da ligação 1,6 dos dissacáridos por uma α -L-ramnosidase, uma α -L-arabinosidase ou uma β -D-apiosidase, havendo libertação de ramnose, arabinose, apiose e de β -D-glicósidos. Na segunda etapa dá-se a quebra da ligação açúcar-aglicona aromática por acção de uma β -D-glicosidase, de acordo com o representado na figura 1.28.

Recentemente, Günata *et al.*, (1998a), verificaram a existência de uma endoglicosidase nas películas das uvas *Muscat d'Alexandrie* capaz de hidrolisar a ligação heterosídica libertando numa só etapa a aglicona volátil.

Durante o envelhecimento os terpenóis podem sofrer reacções de hidratação e oxidação formando outros compostos terpénicos (Strauss *et al.*, 1986). Os polióis, de acordo com Williams *et al.*, (1980), podem sofrer rearranjos ao pH enológico e à temperatura do mosto, originando compostos com menor limiar de percepção olfactiva.

Os ácidos gordos encontram-se na uva esterificados e associados a diferentes classes de lípidos: fosfolípidos (64% a 71% dos lípidos totais), lípidos neutros (17-24%) e glicolípidos (8-14%). O teor de ácidos gordos na película é cerca de 1,5 a 3 vezes superior ao da polpa. A película é também mais rica em glicolípidos que são os mais ricos em ácidos linoleico e linolénico (Roufet *et al.*, 1987).

Por acção da luz e de algumas enzimas (*polifenoloxidase*, *lipoxigenase*) os carotenóides das uvas podem degradar-se em fragmentos mais pequenos, com 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono, mais solúveis, mais voláteis e mais odoríferos que os compostos de origem (Razungles, 1985). Os compostos com 13 átomos de carbono (norisoprenóides em C_{13}), são os que apresentam propriedades odoríferas mais interessantes. A maior parte destes norisoprenóides em C_{13} existem nas uvas na forma

de β -glucopiranosídeo. A maior parte das agliconas não tem propriedades aromáticas mas podem actuar no vinho como precursores de compostos odoríferos.

Alguns fenóis voláteis como os ácidos cafeico, *p*-coumárico e ferúlico, podem actuar como precursores de compostos aromáticos uma vez que são susceptíveis de sofrerem reacções de isomerização, oxidação, redução e hidrólise transformando-se noutros compostos, nomeadamente fenóis voláteis odoríferos (Bayonove *et al.*, 1998). A levedura é capaz de descarboxilar os ácidos fenólicos formando fenóis voláteis. Estes ao pH do vinho, podem sofrer reacções durante a conservação e envelhecimento (Dugelay *et al.*, 1993).

1.5 EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS AO LONGO DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento do vinho deverá ser caracterizado por uma evolução harmoniosa dos diferentes constituintes da cor, do aroma e do sabor (Chisholm *et al.*, 1995; Clímaco, 1987). A cinética das transformações no entanto não é a mesma para todos os vinhos. Depende de condições exteriores, relacionadas com fenómenos oxidativos, com a temperatura e com o tempo de conservação, e da constituição do próprio vinho particularmente da composição fenólica.

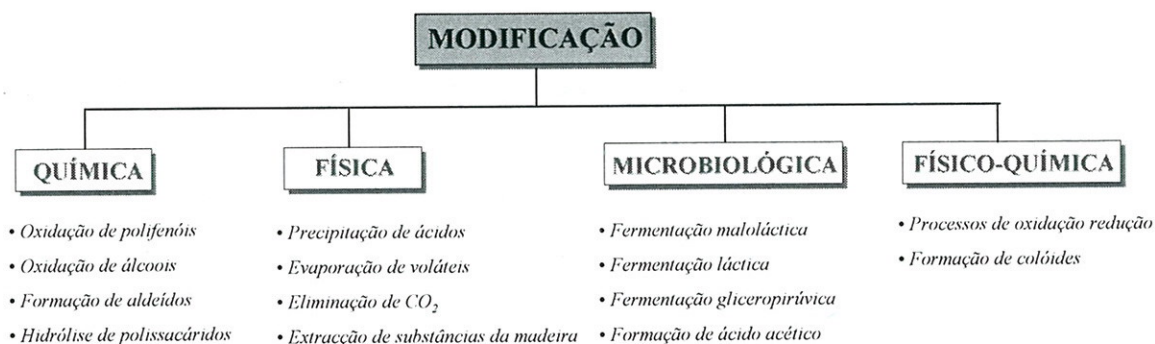


Figura 1.29 – Principais transformações sofridas pelo vinho durante o envelhecimento em cascos de madeira.

A acção conjugada da oxidação, da evaporação (etanol e água em contracorrente com a difusão do oxigénio) e da cedência de substâncias ao vinho pela madeira dos cascos, originam uma série de transformações (figura 1.29) que conferirão ao vinho o “*bouquet*” característico do envelhecimento (Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Spillman *et al.*, 1998; Spillman *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 1996; Towey e Waterhouse, 1993).

Nesta secção daremos ênfase aos compostos aromáticos susceptíveis de sofrerem alterações durante os processo de armazenamento do vinho. Durante este período o vinho Madeira estagia em cascos de madeira de carvalho Francês, de grande porte, atestados, minimizando deste modo o processo de oxidação. As adegas situam-se regra geral em locais de grande exposição solar, atingindo o seu interior temperaturas, que no Verão rondam os 30-35°C.

1.5.1 Compostos monoterpénicos e norisoprenóides em C₁₃

Ao pH enológico os monoterpénóis sofrem várias reacções químicas: hidrólises, isomerizações, ciclizações, hidratações e desidratações, conduzindo a uma profunda modificação na composição varietal dos vinhos. Estas transformações moleculares dependem essencialmente do pH (regra geral quanto menor o valor de pH maior é a cinética de transformação) e da temperatura de armazenamento do vinho (Di Stefano, 1989).

De acordo com alguns investigadores, (Voirin *et al.*, 1990; Di Stefano, 1989; Rapp, 1987) durante a conservação os monoterpénóis podem sofrer rearranjos em meio ácido, conduzindo à alteração do perfil terpénico com forte diminuição ou mesmo desaparecimento dos terpenóis inicialmente presentes e formação de outros compostos terpénicos.

Ao pH do vinho, 3,0-3,5, e durante a conservação, o linalol, o nerol e o geraniol sofrem rearranjos originando outros terpenóis como o α -terpineol, hidroxi-7-di-hidro-6,7-nerol, hidroxi-7-di-hidro-6,7-linalol e hidroxi-7-di-hidro-6,7-geraniol (Rapp e Güntert, 1985). A figura 1.30, exemplifica esses rearranjos moleculares ao pH enológico. Estes mesmos terpenóis, em condições que simulam o envelhecimento acelerado (pH=1,0; 100°C; 15 min) originam, principalmente, compostos terpénicos cíclicos, como o 1,4-cineol, o 1,8-cineol, as *cis* e *trans*-terpina, o *p*-cimeno, o α -

terpineol, compostos estes termodinamicamente mais estáveis que os seus precursores iniciais (Williams *et al.*, 1982a).

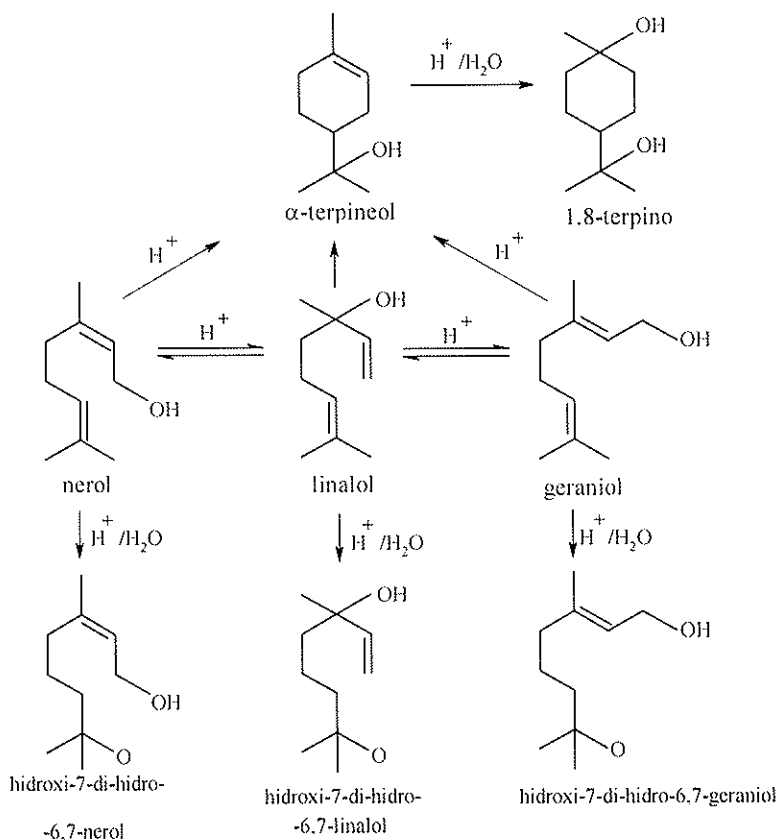


Figura 1.30 – Algumas modificações moleculares dos terpenóis em meio ácido (adaptado de Rapp e Güntert 1985).

Outros investigadores (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975), verificaram ao fim de algum tempo de conservação e à temperatura ambiente, o aparecimento de quatro derivados hidroxilados não odorantes do linalol, os óxidos furânicos e pirânicos do linalol e o desaparecimento do linalol pressupondo a ocorrência de modificações moleculares. A figura 1.31 exemplifica os rearranjos do linalol nos respectivos óxidos.

Os compostos norisoprénicos, que se encontram essencialmente na forma glicosilada, são sujeitos a reacções catalisadas por enzimas ou ácidos, análogas às observadas para os terpenóis.

No decurso da vinificação e conservação surgem novos compostos enquanto que aumentam os teores de outros. Entre estes são de realçar os isómeros do vitispirano

(odor a cânfora, eucalipto), o teaspirano (odor a chá), a β -damascenona (odor a rosa, frutos exóticos) e o 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (odor a querosene) (Strauss *et al.*, 1986). Alguns destes compostos podem formar-se por reacções catalisadas por ácidos a partir de vários precursores norisoprénicos (Versini e Rapp, 1996; Sefton *et al.*, 1993).

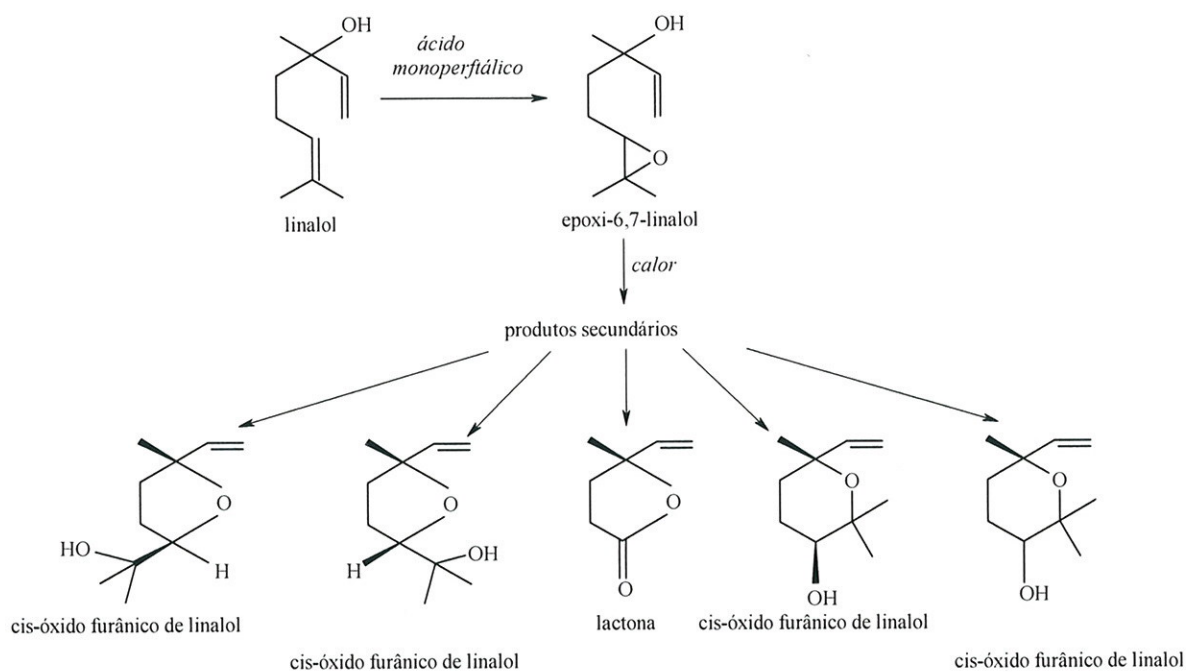


Figura 1.31 – Estruturas químicas e síntese dos óxidos do linalol (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

As diferenças quantitativas entre as variedades em precursores norisoprénicos, podem estar na origem da tipicidade de certos vinhos. O TDN, cujos precursores (3,6-di-hidroxi-7,8-di-hidro- α -ionona, 3,6-di-hidroxi-7,8-di-hidro- β -ionona e 3,9-di-hidroxi-teaspirano) estão presentes no mosto de *Riesling* em concentrações particularmente elevadas, está ligado à tipicidade aromática dos respectivos vinhos velhos (Marais e Rapp, 1988). O teor de TDN é mais elevado em vinhos de regiões vitícolas quentes do que temperadas. A exposição das uvas ao sol e o grau de maturação aumentam a síntese dos precursores de TDN (Marais *et al.*, 1992; Strauss *et al.*, 1987).

Após terem submetido mostos e vinhos a temperaturas entre 45-50°C durante 15 a 20 dias e em condições anaeróbias, Simpson e Miller (1983), detectaram a presença de vitispirano, β -damascenona e TDN. Com estas mesmas condições Francis *et al.*, (1994), verificaram que o aroma floral de vinhos *Chardonnay* e *Semillon*, evolui para notas de “chá”, de “mel”, de “madeira” e de “fumo” características de vinhos velhos.

1.5.2 Ésteres e álcoois superiores

No decurso do envelhecimento a evolução dos teores em ésteres é determinada pelo equilíbrio da reacção de esterificação entre o ácido e o álcool. A cinética das reacções depende, essencialmente, da concentração dos reagentes, do pH e da temperatura.

Durante o processo de conservação e envelhecimento do vinho, ocorre uma diminuição diferenciada de vários ésteres etílicos de ácidos gordos e um aumento substancial dos ésteres de ácidos fixos, sobretudo para valores baixos de pH (Marais, 1978; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). Verifica-se o desaparecimento gradual das características varietais do aroma e o aparecimento do “*bouquet*”, o que leva a supor que a hidrólise dos ésteres é provavelmente mais importante que a sua formação por esterificação.

Os trabalhos de Marais (1978) e de Rapp e Güntert (1985), constataam a diminuição dos teores dos três acetatos de álcoois superiores no decurso do armazenamento em garrafa. Os resultados obtidos por Silva Ferreira (1998) para os vinhos do Porto, estão em desacordo com os de Marais e Rapp. Este autor constatou uma forte correlação entre a concentração de acetato de isoamilo e o tempo de armazenamento, expressa no elevado coeficiente de correlação obtido, $r=0,917$. Para os outros dois acetatos, a relação obtida não foi tão evidente. A evolução do acetato de isoamilo durante o envelhecimento pode dividir-se em duas etapas. Num primeiro período os teores resultantes do processo fermentativo são superiores aos da posição de equilíbrio, predominando a hidrólise dos vinhos novos tendo em conta os baixos teores em ácidos. Num segundo período, ocorre a formação de acetato provocada pelo aumento do ácido acético resultante da oxidação do vinho. Para vinhos da variedade *Colombard*, os acetatos praticamente desaparecem após 16 semanas de conservação a

30°C e a pH 3,0, enquanto que a pH 3,7, e ao fim do mesmo período de conservação, apresentam cerca de 1/3 do teor inicial (Ramey e Ough, 1980).

A evolução observada para os ésteres etílicos de ácidos gordos no decurso do envelhecimento permite diferenciar o formiato de etilo e o acetato de etilo, cujos teores aumentam significativamente com o tempo de modo aparentemente linear (Silva Ferreira, 1998), dos outros ésteres relativamente aos quais não há uma tendência nítida. Vários trabalhos fazem referência quer a um aumento (Rapp e Güntert, 1985) quer a uma diminuição (Simpson, 1979b; Marais, 1978) dos ésteres etílicos dos ácidos gordos no decurso do armazenamento. Qualquer que seja a evolução da concentração dos ésteres no decurso de envelhecimento, o seu comportamento deve ser interpretado em função do ácido que participa na reacção de esterificação.

Os teores dos ésteres etílicos dos ácidos fixos (lactato, succinato, malato, tartarato e citrato) estão relacionados com a duração do envelhecimento. Silva Ferreira, (1998) observou uma evolução do tipo logarítmica para praticamente todos estes ésteres com excepção do citrato de trietilo cuja evolução se aproxima da linearidade. Nos vinhos *Xerez*, Brock *et al.*, (1984) verificaram um comportamento semelhante.

Dos vários trabalhos referentes à evolução deste grupo de compostos (Rapp e Güntert, 1985; Williams *et al.*, 1983; Shinohara e Shimizu, 1979), os autores são unânimes em considerar este tipo de evolução. Silva Ferreira (1998) verificou, que no caso do vinho do Porto, o aumento dos teores dos ésteres dos ácidos fixos ocorre, sensivelmente, até aos vinte anos de armazenamento. A partir deste período não ocorre uma variação significativa.

Dos poucos estudos até hoje efectuados sobre a evolução dos álcoois superiores ao longo do envelhecimento, constata-se uma evolução pouco significativa destes compostos durante a conservação do vinho (Marais *et al.*, 1992).

1.5.3 Compostos carbonilados

No decurso do envelhecimento oxidativo, a oxidação dos álcoois e a acção de leveduras conduz a um aumento do teor de aldeídos. Compostos carbonilados como o isobutiraldeído, o isovaleraldeído, a nonan-2-ona e a undecan-2-ona (Silva Ferreira e Bertrand, 1996) conferem aos vinhos notas a “ranço”. Intervêm na tipicidade dos

“*sherries*” (Otsuka *et al.*, 1980, referenciado por Silva Ferreira, 1998) e dos vinhos novos do *Jura* (Charpentier *et al.*, 1996).

De acordo com Silva Ferreira (1998), os teores de acetaldeído, glioxal e metilglioxal nos vinhos do Porto, aumentam linearmente com o tempo de envelhecimento. No que se refere ao diacetilo, o mesmo autor verificou que não existe uma tendência particular na evolução dos teores deste composto com a idade.

Nos vinhos sujeitos a envelhecimento oxidativo, como o vinho Madeira e o vinho do Porto, os teores do acetaldeído são frequentemente superiores ao seu LPO. Vários acetais, resultantes da reacção de acetalização entre os aldeídos e os álcoois, foram detectados em vinhos fortificados e oxidados. O principal é o 1,1-dietoxietano, que atinge teores elevados nos vinhos *Xerez* (Brock *et al.*, 1984) e nos vinhos novos do *Jura* (Dubois, 1994). Entre os acetais provenientes do acetaldeído e do glicerol, os *cis*- e *trans*-2-metil-4-hidroximetil-1,3-dioxolanos e os *cis*- e *trans*-2-metil-5-hidroxi-1,3-dioxanos, foram encontrados nos vinhos do Porto (Silva Ferreira *et al.*, 2002). De acordo com Silva Ferreira (1998), a evolução dos teores destes compostos no decurso do envelhecimento no vinho do Porto é similar. As suas concentrações estão fortemente relacionadas com a duração do armazenamento, aumentando de modo aparentemente linear.

1.5.3.1 Lactonas

No decurso do envelhecimento estes compostos evoluem de modo diferenciado. Para algumas lactonas os teores aumentam ao longo da conservação, enquanto que para outras a variação não é significativa, caso da 4-butirolactona. Silva Ferreira (1998) constatou no entanto que os vinhos mais velhos apresentavam teores ligeiramente mais elevados que os vinhos novos. Durante o envelhecimento oxidativo, esta lactona pode ser formada de acordo com o processo descrito na figura 1.24. Podem distinguir-se dois tipos de evolução dos teores no decurso do envelhecimento para as outras lactonas C4 e C5, doseadas no vinho do Porto. Deste modo, observa-se um aumento das concentrações da 4-pentanolactona contrariamente às outras lactonas saturadas para as quais não foram detectadas variações significativas. Qualquer que seja a evolução

destes compostos no decurso do tempo, a sua influência no aroma do vinho do Porto velho, de acordo com Silva Ferreira (1998), é muito limitada.

Entre as várias lactonas identificadas nos vinhos *Xerez*, provenientes essencialmente do metabolismo levuriano, a solerona (5-oxo-4-hexanolactona), é a mais abundante nos vinhos envelhecidos sob véu de leveduras. Não apresenta, no entanto, qualquer impacto aromático mesmo considerando as concentrações máximas encontradas nos vinhos, $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Martin *et al.*, 1992).

Entre as lactonas, a única que tem um importante impacto aromático é o sotolon (4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona). Confere odores a “noz” e “especiarias” e apresenta um LPO bastante baixo, da ordem dos $19 \mu\text{g.L}^{-1}$, nos vinhos do Porto (Silva Ferreira, 1998). Apresenta teores elevados em vinhos conservados sob véu de leveduras, como o *Xerez*, *Tokai* e do *Jura* (Guichard *et al.*, 1997; Pham *et al.*, 1996), estes com teores que ultrapassam os $350 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Guichard *et al.*, 1997). Silva Ferreira (1998) identificou pela primeira vez este composto no vinho do Porto. Verificou um aumento linear do sotolon com o tempo de envelhecimento tendo constatado ser o composto responsável pelo aroma típico dos vinhos do Porto velhos (Silva Ferreira *et al.*, 2003b).

O impacto olfactivo deste composto no aroma dos vinhos varia em função da sua concentração. Para teores a partir de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, Masuda *et al.*, (1984) descrevem o aroma do sotolon próximo de “caramelo” e “açúcar torrado”. Para Sulser *et al.*, (1972; referenciado por Silva Ferreira), o aroma conferido pelo sotolon assemelha-se a “noz” para concentrações próximas de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, e a “especiarias” e “caril” quando os teores atingem valores próximos dos 5 mg.L^{-1} .

Foi identificado em diversos produtos alimentares, encontrando-se igualmente no melaço de cana de açúcar, em certos vinhos botritizados e em champagne.

De acordo com Cutzach *et al.*, (1998), a sua formação é influenciada pela presença de oxigénio e pela cor do vinho. Em condições similares de conservação e com a mesma idade, os vinhos brancos apresentam teores de sotolon superiores aos vinhos tintos. A presença de compostos polifenólicos, moléculas antioxidantes, parecem retardar a formação do sotolon nos vinhos tintos.

Pode ser formado quimicamente, nas condições do pH e do teor alcoólico do vinho Madeira, por aldocondensação do ácido α -cetobutírico seguida de lactonização (figura 1.32). O ácido α -cetobutírico é produzido por desaminação bioquímica da

treonina com o etanal proveniente da oxidação do etanol, ou por condensação de duas moléculas de etanal. No decurso do envelhecimento, o etanol transforma-se quimicamente em etanal permitindo, na ausência de dióxido de enxofre, a formação do sotolon.

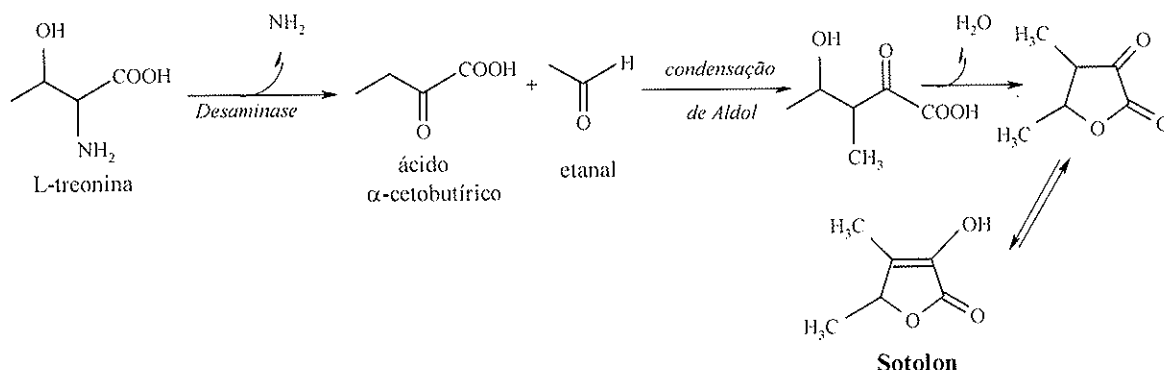


Figura 1.32 - Formação do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon) a partir do ácido α -cetobutírico (adaptado de Silva Ferreira, 1998).

Para Blank e Fay (1996), o sotolon pode ser formado no decurso da reacção de Maillard, sendo um dos produtos obtidos a partir de certas hexoses e pentoses na presença da cisteína.

Em função da estrutura ramificada, a formação do sotolon pode ser explicada a partir dos açúcares no decurso da reacção da Maillard simplesmente por rearranjos nos intermediários de Amadori como no caso do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona. Assim, o sotolon resultará da condensação entre os produtos de cadeia curta resultantes deste processo. Hofman e Shieberle (1997), demonstraram que o sotolon pode ser obtido por uma reacção de condensação aldólica entre a butano-2,3-diona e o hidroxiacetaldeído (figura 1.33).

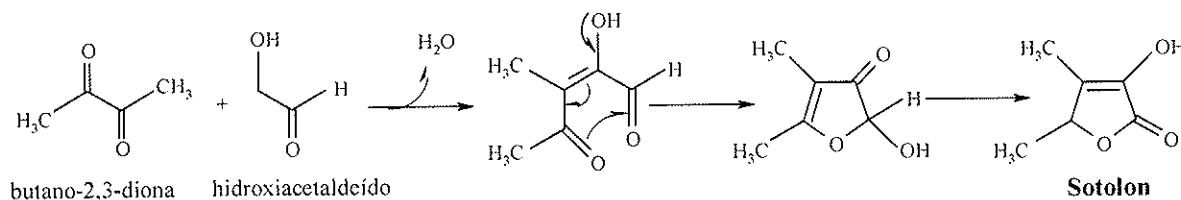


Figura 1.33 - Mecanismo proposto para a formação do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon) de acordo com a reacção de Maillard (adaptado de Silva Ferreira 1998).

1.5.3.2 Adeídos furânicos

Os aldeídos furânicos, furfural, 5-metilfurfural e 5-(hidroximetil)furfural, são descritos como constituintes de diversas bebidas fortificadas. Rapp e Güntert (1985), descrevem três mecanismos reaccionais conducentes à sua formação: *pirólise dos hidratos de carbono*, *desidratação dos açúcares em meio ácido* e a *reacção de Maillard*.

A figura 1.34 representa um possível mecanismo de formação e degradação do 5-(hidroximetil)furfural a partir dos açúcares.

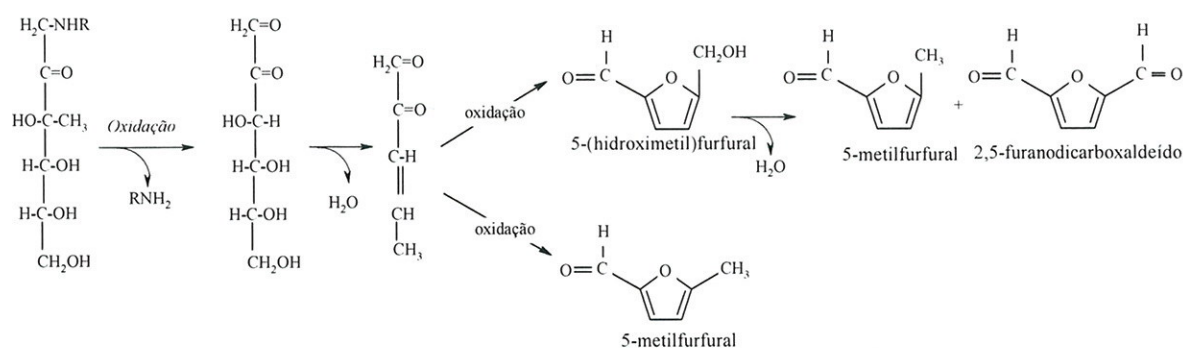


Figura 1.34 - Possível mecanismo de formação e degradação do 5-(hidroximetil)furfural a partir da D-glucose (adaptado de Cutzach et al., 1998).

Por perda de uma molécula de água no carbono C-3, a glucose forma em meio ácido, a 3-desoxialdocetose que por desidratação seguida de ciclização origina o 5-(hidroximetil)furfural. Na ausência de oxigénio é um composto estável, mas na sua presença dá origem ao 5-metilfurfural e ao 2,5-furanodicarboxaldeído.

Estes compostos apresentam uma evolução linear com o envelhecimento, pelo que foram propostos, por alguns autores (Silva Ferreira, 1998; Rapp e Güntert, 1985), como possíveis marcadores da idade do vinho.

Cutzach et al., (1999) verificaram que ao pH do vinho e em condições anaeróbias, o 5-(hidroximetil)furfural origina o 5-(etoximetil)furfural podendo também formar-se por condensação entre o etanol e o HMF (figura 1.35).

Este aldeído é caracterizado por um odor a “canela”, a “noz” e a “frutos secos”, dependendo da concentração em que se encontra. Associado a outros compostos pode participar com nuances a “café”. De acordo com Bertuccioli e Viani (1976), apresenta

igualmente odores “frutados”, picantes” e a “pão branco”. O seu limiar de percepção olfativo é de $90 \mu\text{g.L}^{-1}$.

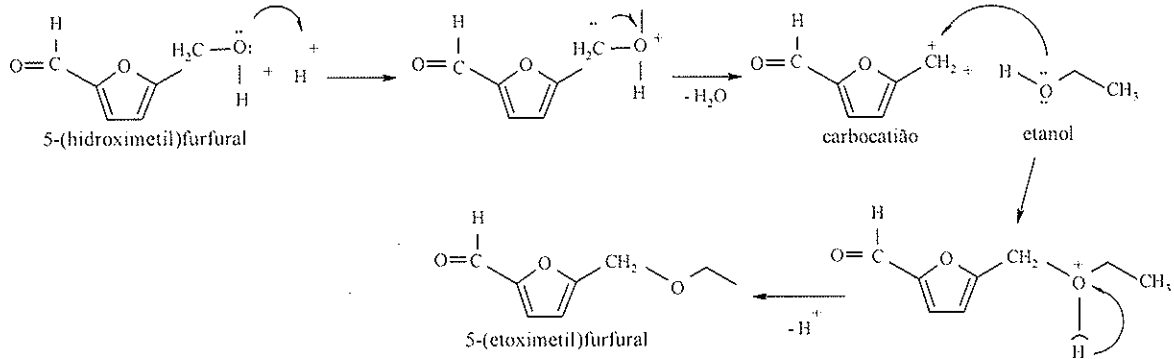


Figura 1.35 - Possível mecanismo de formação do 5-(etoximetil)furfural a partir do 5-(hidroximetil)furfural (adaptado de Cutzach *et al.*, 1998).

1.5.4 Outros compostos

A evolução da composição dos aminoácidos no decurso do envelhecimento é pouco conhecida. Parece no entanto, que a maioria diminui rapidamente com o tempo de conservação (Silva Ferreira, 1998). Durante o envelhecimento, alguns destes compostos participam em diferentes reacções químicas actuando como precursores de substâncias com forte impacto organoléptico, como certas lactonas a partir do ácido glutâmico (Müller *et al.*, 1973), ou o sotolon a partir de treonina (Pham *et al.*, 1995).

Relativamente às amins biogénicas, e de acordo com Silva Ferreira (1998) os teores da tiramina, da 3-metilbutilamina e da feniletilamina, não apresentam qualquer relação com a idade dos vinhos, contrariamente à metilamina, etilamina, histamina, diaminobutano e diaminopentano, cujos teores diminuem durante o envelhecimento.

Entre as acetamidas, distinguem-se dois grupos em função do seu comportamento ao longo do tempo (Silva Ferreira, 1998). Assim, os teores da N-metilacetamida e N-etilacetamida diminuem ligeiramente com o tempo de envelhecimento, enquanto que, os teores da N-(3-metilbutil)acetamida e da N-(2-feniletil)acetamida, aumentam de modo aparentemente linear (Silva Ferreira, 1998). A formação das acetamidas no decurso do tempo parece ser uma reacção puramente química, como ilustra a figura 1.36.

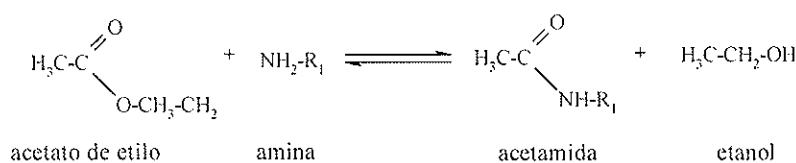


Figura 1.36 – Mecanismo de formação das acetamidas no decurso do envelhecimento do vinho (adaptado de Silva Ferreira, 1998).

No decurso da conservação do vinho os teores em vinilfenóis voláteis diminuem (Dugelay, 1993), Dugelay *et al.*, (1993). Chatonnet *et al.*, (1993), verificaram que após um ano de conservação em garrafa o teor de vinilfenóis decresceu cerca de 60%, quer em vinhos tintos quer em vinhos brancos. A reactividade da ligação vinílica poderá estar na origem desta diminuição, devido à formação do 4-(1-etoxietil)fenol e do 4-(1-etoxietil)guaiacol por reacção de adição do etanol à dupla ligação, a partir do vinilfenol e vinilguaiacol, respectivamente (Dugelay *et al.*, 1995). Apesar do significativo aumento no decurso da conservação, os etoxietilfenóis assim formados não apresentam qualquer impacto olfactivo nos vinhos. A formação de oligómeros vinílicos e a adição de outros nucleófilos do vinho aos vinilfenóis durante a conservação, são outros factores que conduzem à diminuição do teor destes compostos.

Os teores de etilfenóis aumentam durante a conservação, especialmente nos vinhos tintos, podendo atingir teores prejudiciais à qualidade organoléptica do vinho. A actividade bacteriana e o desenvolvimento de leveduras, nomeadamente a *Brettanomyces/Dekkera*, explicam o aumento verificado (figura 1.27) (Chatonnet *et al.*, 1992a).

Formam-se igualmente durante a conservação do vinho pequenas quantidades de fenóis voláteis como a vanilina, a zingerona e o eugenol, provenientes provavelmente, da hidrólise dos glicósidos da uva (Dugelay, 1993; Sefton *et al.*, 1993).

Conforme referido anteriormente, a maioria dos compostos sulfurados estão associados a odores desagradáveis. No entanto alguns destes compostos, caso do DMS, contribuem positivamente para o aroma dos vinhos. Durante a conservação do vinho, o teor deste composto aumenta frequentemente, acentuando-se para temperaturas mais elevadas (Marais e Pool, 1980). Este aumento de concentração é acompanhado da diminuição do teor do DMSO, possível precursor do DMS. A concentração máxima

(7,6-68,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$) é atingida ao fim de 5-10 anos de conservação, diminuindo posteriormente. De acordo com De Mora *et al.*, (1986) o DMS pode ser formado a partir da metionina e da cisteína.

O etanotiol, responsável pelo odor a “cebola”, pode atingir teores superiores ao seu limiar de percepção olfactiva, 1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em vinhos brancos, de acordo com Park *et al.*, (1994) e Goniak e Noble, (1987).

De acordo com Guedes de Pinho (1994), a concentração do *bis*-(2-hidroxiethyl)dissulfureto diminui rapidamente, com tendência a anular-se, durante o tempo de conservação do vinho, mesmo que o armazenamento se processe a baixas temperaturas. Os teores do 2-mercaptoetanol e do metionol decaem exponencialmente com a idade do vinho e na presença de oxigénio, de acordo com Silva Ferreira *et al.*, (2003). Contrariamente a estes compostos, e de acordo com os mesmos autores, os teores da dimetilsulfona aumentam ligeiramente com a conservação do vinho.

De salientar que durante a conservação em cascos de madeira, ocorre a difusão para o vinho de substâncias voláteis entre as quais se destacam compostos com estrutura guaiacil e seringil, furanos e piranos substituídos, γ -lactonas, compostos norisoprénicos, pirazinas e piridinas (Dubois, 1994b; Sefton *et al.*, 1990; Chatonnet *et al.*, 1990), contribuindo para a complexidade do sabor e do “*bouquet*” dos vinhos velhos. A origem botânica e geográfica do carvalho, as condições de fabrico e de utilização dos cascos, podem influenciar qualitativa e quantitativamente a extracção.

Vários fenóis voláteis da madeira, como o gaiacol, o 4-metilguaiacol, o 4-propilguaiacol, o 4-etil-2,6-dimetoxifenol, o eugenol, algumas fenilcetonas em particular a butirovanilina, alguns aldeídos, nomeadamente a vanilina e o seringaldeído, são igualmente cedidos ao vinho no decurso da conservação (Chatonnet *et al.*, 1990). Os quatro primeiros compostos são específicos da madeira e não existem no vinho base. Outros como o eugenol e a vanilina, encontram-se nos vinhos em concentrações vestigiais estando o seu aumento durante o envelhecimento associado, essencialmente, à cedência por parte da madeira dos cascos onde são armazenados.

No decurso da conservação em madeira verifica-se igualmente um aumento dos teores das β -metil- γ -octanolactonas. O isómero *cis*- além de ser o mais abundante é também o mais odorante, com um LPO de 74 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em vinhos tintos e de 92 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em vinho brancos (Chatonnet *et al.*, 1990). Conferem aos vinhos notas diferenciadas, a

“coco” para a *trans*-3-metil-4-octanolactona e a “whisky” para a *cis*-3-metil-4-octanolactona (Chatonnet, 1995).

As quantidades de taninos dissolvidas durante a conservação não podem ser negligenciadas. Estima-se que no primeiro ano de conservação a quantidade de tanino cedida pela madeira seja de 200 mg.L⁻¹.

1.6 INFLUÊNCIA DAS OPERAÇÕES TECNOLÓGICAS NO AROMA DO VINHO

No processo de vinificação há diversas operações, como os processos de vindima, o esmagamento e prensagem, a maceração pelicular, a clarificação, entre outros, que podem contribuir de forma decisiva para as características aromáticas do vinho. Não menos importantes são os processos de estabilização e as condições de conservação dos vinhos.

Do grau de maturação da uva, das condições sanitárias e do estado geral da vindima, dependerá em grande parte a quantidade e qualidade dos compostos extraídos. A carga da vinha é outro factor a ter em conta.

A prensagem confere um enriquecimento dos mostos e dos vinhos em compostos característicos da variedade e álcoois em C₆ (Kinzer e Schreier, 1980). Versini *et al.*, (1981) obtiveram, para uvas da casta *Riesling*, mostos de prensa 7 a 8 vezes mais ricos em geraniol, nerol e citronelol livres, e 2 a 4 vezes mais ricos para os restantes terpenóis. Consoante a sua localização no bago, os terpenóis são extraídos de maneira diferenciada. Os mostos obtidos dos primeiros esmagamentos são particularmente ricos em linalol, enquanto que os provenientes das últimas prensagens são mais ricos em geraniol (Seguin, 1994). O mosto da última prensagem é cerca de 10 vezes mais rico em álcoois em C₆ e 4 vezes mais rico em terpenóis, do que o mosto de gota correspondente. O aumento da pressão traduz-se em maiores teores de hexan-1-ol e (Z)-hex-2-en-1-ol (Mesias *et al.*, 1983).

A maceração pelicular é uma técnica susceptível de enriquecer os mostos e os vinhos em compostos aromáticos constituintes do aroma varietal na sua forma livre e de precursores (Baumes *et al.*, 1989). Ocorre também a difusão de compostos

fenólicos, aminoácidos e ácidos gordos (Ferreira *et al.*, 1995). A temperatura e o tempo de contacto, são os principais factores que afectam a quantidade e o tipo de compostos extraídos (Baumes *et al.*, 1989). Estes factores no entanto dependem do grau de maturação da uva e sobretudo do tipo de vinho que se deseja produzir (Dubourdiou, 1986). De acordo com Ramey *et al.*, (1986), temperaturas inferiores a 10°C e curtos períodos de tempo, conduzem à obtenção de vinhos com pouca adstringência.

A clarificação dos mostos é outra operação que se reveste de grande importância dado condicionar a quantidade de matéria suspensa presente na fermentação alcoólica. Singleton *et al.*, (1975) verificaram que os vinhos obtidos a partir de mostos clarificados apresentavam menor adstringência e menor quantidade de sulfureto de hidrogénio, comparativamente aos mostos da mesma casta não clarificados. Para Bertrand (1989) mostos clarificados originam vinhos com menor teor em álcoois superiores e maior teor de ésteres. De acordo com o mesmo autor, mostos muito clarificados podem provocar “amuos” de fermentação por falta de nutrientes. Ollivier *et al.*, (1987) postulam que cada casta possui um óptimo para a clarificação dos mostos.

1.7 ANÁLISE MULTIVARIÁVEL APLICADA À CARACTERIZAÇÃO DE MOSTOS E VINHOS

1.7.1 Conceitos gerais

O aperfeiçoamento, aliado ao crescimento exponencial da instrumentação analítica de elevada resolução e o aparecimento da quimiometria, de grande utilidade quando bem aplicada, têm permitido obter conclusões importantes sobre diversos parâmetros na área da enologia, como sejam na transformação/evolução de componentes químicos quer no decurso da maturação das uvas quer durante a conservação/envelhecimento do vinho, na diferenciação química de castas a partir de compostos específicos e na caracterização aromática de mostos e vinhos provenientes de diferentes regiões.

A grande quantidade de informação fornecida em cada análise por equipamentos cada vez mais sensíveis, torna imprescindível o uso de métodos de

análise multivariável como sejam a análise de variância (Anova), a análise de componentes principais (PCA)², a análise discriminante linear (LDA)³ e a análise de agrupamento hierárquico (cluster), entre outras.

De entre os vários métodos utilizados com o intuito de reduzir a dimensionalidade de uma matriz de dados, a análise de componentes principais (PCA) tem sido um dos mais usados no que se refere a tratamento de dados em enologia e outras áreas afins. Permite transformar um conjunto de variáveis iniciais correlacionadas entre si (x_1, x_2, \dots, x_p) noutra conjunto com um menor número de variáveis não correlacionadas (ortogonais) e designadas por componentes principais (y_1, y_2, \dots, y_p), que resultam das combinações lineares das variáveis iniciais.

Os coeficientes (pesos) a_{ij} , $i=1, \dots, p$; $j=1, \dots, p$, que definem cada uma das novas variáveis são escolhidos de modo que as variáveis derivadas (componentes principais) expliquem a variância máxima nos dados originais e não estejam correlacionados entre si. O modelo das componentes principais pode ser escrito como :

$$y_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1p}x_p$$

$$y_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2p}x_p$$

...

$$y_p = a_{p1}x_1 + a_{p2}x_2 + \dots + a_{pp}x_p$$

Os componentes principais são calculados por ordem decrescente de importância, isto é, a primeira explica a máxima variância dos dados, a segunda a máxima variância ainda não explicada pela primeira, e assim sucessivamente.

Os coeficientes que definem os componentes são derivados de modo que a soma dos seus quadrados iguale a unidade, isto é, $\sum_{j=1}^p a_{ij}^2 = 1$, para todo o i . O programa estatístico modifica-os, multiplicando os coeficientes que definem uma componente pela raiz quadrada da variância dessa componente de forma a representarem a correlação entre as variáveis observáveis e as componentes. A variância dos componentes designa-se por valores próprios. Na maioria das aplicações, a análise é baseada na matriz das correlações, isto é, em variáveis normalizadas, pois geralmente as variáveis estão medidas em escalas ou grandezas diferentes, não tendo sentido a

² PCA – Principal Component Analysis, do Inglês.

³ LDA – Linear Discriminant Analysis; do Inglês.

combinação linear das variáveis não normalizadas. A normalização mais utilizada é a transformação Z , pela qual a matriz das covariâncias é igual à matriz das correlações. A normalização é feita da seguinte forma:

$$Z_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)}{s_j}$$

em que, x_{ij} é o valor original da variável, Z_{ij} é o novo valor da variável, \bar{x}_j a média simples dos valores correspondentes à variável e s_j o seu desvio padrão

O número de componentes principais que melhor descrevem o conjunto de dados baseia-se em vários critérios, sendo os mais frequentemente utilizados o *critério de Kaiser*, que consiste em excluir os componentes cujos valores próprios são inferiores à unidade; e a *percentagem de variância explicada*, que procura o grupo de variáveis que maximizam a percentagem da variância total. Este foi o critério por nós utilizado.

Antes de iniciar a análise deve explorar-se individualmente cada variável em termos de valores aberrantes e do enviesamento da distribuição. Deve igualmente analisar-se o número de não respostas, pois quando são elevadas e não são aleatórias, podem caracterizar segmentos da população com características diferentes, distorcendo os resultados da análise.

Relativamente à relação entre o número de objectos (n) e o número de variáveis (p), alguns investigadores defendem que aquele deverá ser pelo menos igual ao número de variáveis. Outros advogam que a razão n/p deverá ser igual a 2 ou mesmo 3, permitindo maximizar a fiabilidade dos resultados. Embora um maior número de variáveis forneçam maior quantidade de informação, estas deverão ser adequadas ao problema em questão pois só assim poderão fornecer alguma informação estrutural, pelo que não raras vezes se torna necessário eliminar algumas variáveis irrelevantes que apenas mascaram ou dificultam a interpretação dos resultados.

Uma outra parte dos métodos de análise multivariável tem por objectivo a obtenção de modelos previsores, situando-se entre a análise de dados exploratória e a análise confirmatória. O mais comumente utilizado é a análise discriminante linear (LDA). O seu princípio consiste em encontrar combinações lineares das variáveis independentes utilizadas (X_i) para discriminar indivíduos pertencentes a diferentes grupos. Cada combinação linear (Y_i) constitui uma *função discriminante*:

$$Y_i = a_{i0} + a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{ip}X_p$$

em que os coeficientes de ponderação a_{ij} permitem identificar as variáveis que mais contribuem para distinguir os grupos dentro de uma mesma função Y_i , e os X_{ij} são as variáveis discriminantes. Idealmente deveria ser possível encontrar, para uma dada função discriminante, valores idênticos para todos os casos pertencentes a um mesmo grupo. Simultaneamente, as funções são determinadas de modo a maximizarem a separação entre os diferentes grupos.

A utilização da análise discriminante como técnica de classificação pode ser efectuada depois de se ter encontrado um conjunto de variáveis que permitam a discriminação significativa dos grupos, para os quais se conhece a distribuição por grupos. É então possível estimar um conjunto de funções que permitirão a classificação de novos casos, não agrupados *à priori*.

Para testar a validade das funções discriminantes é possível classificar o conjunto de casos originais e comparar os agrupamentos conseguidos com os grupos predefinidos e assim estimar a percentagem de casos correctamente classificados a partir das variáveis utilizadas.

Para que a análise discriminante possa ser aplicada, os grupos deverão ser retirados de populações com distribuição normal para as p variáveis discriminantes, e a variabilidade intergrupo deverá ser idêntica.

Tem sido com base neste métodos da análise multivariável que muitos dos dados referentes a mostos e vinhos têm sido analisados.

1.7.2 Aplicação à análise de mostos e vinhos

No que se refere à utilização da análise multivariável em enologia, data da década de 60 altura em que Amerine *et al.*, (1965) utilizaram métodos de análise de perfil no tratamento de resultados de análises sensoriais. Contudo, só a partir de inícios dos anos 80 é que se verificou um enorme incremento destes métodos na aplicação de variadíssimos trabalhos em enologia.

Neste sentido, Cordonnier e Bayonove (1974), Rapp *et al.* (1976), Boubals (1977), Rapp *et al.*, (1995), Noble *et al.*, (1980), Marais (1983), Rapp e Mandery (1986), Le Chevanton (1993) entre outros, identificaram e estudaram os aromas varietais em uvas e mostos e a sua evolução nos vinhos, tentando caracterizar as

diversas castas quanto aos seu potencial aromático, reconhecendo que os compostos terpênicos assumem um papel preponderante no aroma varietal.

Recorrendo à análise discriminante Rapp *et al.*, (1995) identificaram alguns compostos chave para a diferenciação das castas *Riesling*, *Muscat Morio* e *Sylvanner*, independentemente da origem geográfica e do estado de maturação.

Noble *et al.*, (1980), determinaram a composição volátil de três vinhos *Vitis vinifera* – *Riesling*, *Chardonnay* e *French Colombard*, por GC, GC-MS e GC-Olfactometria. Selecionaram 27 dos 120 componentes identificados, aos quais aplicaram análise discriminante e análise de componentes principais. A análise de componentes principais permitiu a separação de 10 dos 11 vinhos *Riesling* dos 9 *Chardonnay* e dos 4 *French Colombard*. As funções discriminantes obtidas permitiram agrupar os 24 vinhos em três categorias diferenciadas usando 5 variáveis: o 2-metilpropanoato de etilo, o acetato de 2-metilbutan-1-ol, o 5-metilfurfural, o octanoato de metilo e o 2-feniletanol.

Kwan e Kowalski (1980), estabeleceram a diferença entre a casta *Pinot Noir* cultivada em França e nos EUA, atribuindo ao hexan-1-ol e ao ciclo-hexano essa diferenciação. O *p*-hidroxibenzaldeído e o 2-feniletanol, permitiram diferenciar a mesma casta cultivada na Califórnia de outras regiões dos EUA.

A possibilidade de discriminação entre vinhos Venezianos de Denominação de Origem Controlada, *Soave Classico*, *Prosecco di Compliano e Valdobbiadone* e *Verduzzo del Piave*, foi avaliada, por Moret *et al.*, (1980), com base nos teores de alguns metais alcalinos, pH, acidez total, conteúdo em cinzas e alcalinidade em cinzas. Verificaram que o *Soave Classico* se diferencia do *Prosecco* e do *Verduzzo* em termos de pH, conteúdo em cinzas e alcalinidade em cinzas, e que os teores de sódio e de cloro do *Prosecco* são similares ao do *Soave Classico* mas significativamente diferentes dos *Verduzzo*.

Medina e Van Zeller (1984), diferenciaram vinhos provenientes de três regiões de França, aplicando a análise discriminante e a análise de componentes principais a quatro grupos de substâncias voláteis: *i*) ácidos gordos; *ii*) glicerol e butano-2,3-diol; *iii*) acetato de etilo, metanol e álcoois superiores e *iv*) ésteres, hexanol e 2-feniletanol.

Cabezudo *et al.*, (1985) diferenciaram 85 vinhos de qualidade produzidos em regiões demarcadas, através da análise discriminante, a partir de dados experimentais de diversos autores, utilizando 64 variáveis analíticas.

Tapias *et al.*, (1986) recorreram à análise discriminante, de modo a avaliar a capacidade de caracterização e diferenciação geográfica de quatro vinhos tintos Espanhóis, *Rioja*, *Aragon*, *Tarragona* e *La Mancha*, utilizando como parâmetros químicos o teor alcoólico, a acidez volátil, a acidez titulável, o extracto seco, o conteúdo em cinzas, e o teor dos ácidos málico, lactico e tartárico, correntemente determinados em qualquer laboratório enológico. A classificação correcta de aproximadamente 90 % de amostras desconhecidas, demonstra a adequação das funções discriminantes derivadas e a eficácia dos parâmetros enológicos como variáveis discriminantes.

Lopez *et al.*, (1988) aplicaram a análise de componentes principais para caracterizarem a maturidade das uvas da casta *Pedro Ximenez* por determinação do peso do bago, pH, acidez titulável, glucose, frutose e pelos ácidos tartárico, málico e cítrico. Utilizando a análise de componentes principais e, por representação gráfica dos *scores* dos componentes principais vs tempo, estabeleceram as datas teóricas da maturação.

Com a finalidade de prever o comportamento das castas *Roriz*, *Barroca*, *Touriga Nacional*, e *Touriga Francesa*, no decurso da maturação, de modo a obter a sua diferenciação e possibilitar a correlação das propriedades estudadas com as dos vinhos, Alves (1992) determinou os teores de açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos livres, nas referidas castas. Por aplicação da análise de componentes principais aos resultados dos aminoácidos livres e açúcares à data da maturação, verificou que o ácido glutâmico, a asparagina, a serina, a treonina, a prolina, a frutose e a glucose, permitiam a discriminação das quatro castas.

Garcia-Jares *et al.*, (1995) caracterizaram, por recurso à análise de componentes principais e à análise discriminante, vinhos brancos provenientes de Rias Baixas (Galiza) usando a relação de concentrações das variáveis isoladas por extracção contínua com Freon 11. Verificaram a importância das técnicas de análise multivariável na diferenciação dos vinhos e no estabelecimento de critérios de

genenuidade, permitindo melhorar a qualidade dos vinhos produzidos em regiões demarcadas.

Pena *et al.*, (1999) utilizaram a análise de componentes principais na avaliação de compostos fenólicos e organoclorados relacionados com as alterações sensoriais detectadas nos vinhos. Este tipo de análise multivariável foi também usado para verificar a influência da variedade, do clone e da produção da videira, sobre o perfil antociânico de vinhos tintos de denominação de origem de Navarra (Espanha).

Os dados da influência da maceração pelicular sobre a composição e qualidade de vinhos brancos da Bairrada – *Maria Gomes* e *Bical*, foram explorados por métodos estatísticos multidimensionais por Rocha *et al.*, (2001). Os dados analíticos permitiram uma separação das duas castas, devido essencialmente, aos teores elevados de potássio, cinzas, alcalinidade em cinzas e acidez total determinados para a casta *Bical*, e ao elevado teor em polifenóis totais apresentado pela casta *Maria Gomes*.

Alvarez *et al.*, (1997) aplicaram a análise discriminante a vinhos brancos espanhóis de denominação de origem com o objectivo de os diferenciarem, utilizando 35 variáveis relacionadas com a composição química dos vinhos. Estas foram agrupadas de acordo com a sua afinidade química: *compostos totais*, *álcoois superiores* e *ésteres*, tendo observado que dos três grupos, os ésteres são os que possibilitam uma melhor classificação dos vinhos na denominação respectiva.

Cutzach *et al.*, (1998) estudaram as relações existentes entre os dados da análise sensorial e de compostos voláteis, usando a análise de componentes principais. Os resultados evidenciaram as variações do aroma de vinhos doces naturais durante o envelhecimento.

Ribeiro (1996) utilizando técnicas de análise multivariável, avaliou a capacidade dos aminoácidos livres aliados a outros parâmetros analíticos, caracterizarem as diferentes designações especiais - *Ruby*, *Tawny* e *Vintage*, do vinho do Porto. Estudou ainda o poder discriminante dos aminoácidos livres entre o vinho do Porto e algumas imitações deste vinho.

O mesmo investigador (2001) aplicou a análise de componente principal aos resultados analíticos de 32 compostos (aminoácidos livres e amins biogénicas) em cerca de 70 vinhos comerciais oriundos de 8 subregiões alentejanas produzidos por três produtores, para a caracterização destes vinhos e avaliação da influência de alguns factores variantes dentro da amostragem global como a cor, proveniência e produtor.

Rocha *et al.*, (2000) avaliaram o potencial aromático, nas formas livres e glicosiladas, das castas *Maria Gomes* e *Bical*. Recorrendo à análise de componentes principais determinaram as principais fontes de variabilidade entre os mostos das referidas castas e estabeleceram relações entre as variedades e os compostos voláteis.

A análise de componentes principais, a análise discriminante e a análise de cluster hierárquico, foram utilizadas por Marengo *et al.*, (2001) para diferenciarem quimicamente 68 amostras de vinhos – *Barolo*, *Barbaresco*, *Nebbiolo d'Alba*, *Roero* e *Langhe Nebbiolo*, da região de Piemonte (Itália). Identificaram, por GC-MS, 35 analitos extraídos por SPME/PDMS-100 μm , tendo usado na análise multivariável os dados das áreas dos picos corrigidos para o padrão interno.

Verifica-se, genericamente, que a maioria dos trabalhos que usam a análise multivariável têm como objectivos primordiais, por um lado a caracterização química ou aromática dos vinhos ou das castas que lhe deram origem e por outro a diferenciação de vinhos ou castas consoante a sua origem geográfica. Apesar de certos grupos de compostos como os terpenóis ou os aminoácidos poderem, por si só, discriminar diferentes grupos de vinhos, é usual proceder-se à análise multivariável associando diferentes tipos de parâmetros químicos nessa discriminação.

Capítulo

2

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 METODOLOGIA GLOBAL

Numa primeira fase deste trabalho, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica, por HS-SPME/GC-MS, que permitiu quantificar os compostos voláteis considerados responsáveis pelo aroma varietal dos vinhos. Desta forma, sendo os vinhos a estudar de características monovarietais, pretendeu-se avaliar o efeito deste grupo de compostos químicos na distinção dos mesmos vinhos. Para o efeito foram quantificados alguns álcoois monoterpénicos e norisoprenóides em C₁₃ em mostos e nos vinhos deles resultantes. Procedeu-se á análise multivariável (com base na quantificação dos monoterpénóis) para discriminar entre os diferentes tipos de castas e vinhos.

Posteriormente, surgiu a necessidade de caracterizar mais aprofundadamente os mostos e os vinhos em estudo, nomeadamente em termos de outros compostos voláteis descritos pelos aromas pré- e fermentativos, de forma a obter o seu perfil aromático. Nesta fase, utilizou-se uma metodologia semelhante á validada para os compostos monoterpénicos, embora pelo elevado número de compostos em estudo, não tenha sido possível uma quantificação absoluta da sua maioria, pela falta de padrões disponíveis. Optou-se assim, por executar uma identificação criteriosa através dos espectros de massa e comparar em termos relativos a sua abundância nos objectos em estudo (mostos e vinhos) através da área dos picos obtidos. Procedeu-se a análises multivariável (com base na área relativa dos compostos) para discriminar entre os diferentes tipos de mostos e vinhos.

Nesta etapa foi ainda possível comparar o perfil aromático dos mostos das castas seleccionadas com o perfil aromático obtido com os vinhos da mesma casta.

Numa fase complementar, estudou-se a evolução do perfil aromático dos vinhos ao longo do envelhecimento. Nesta fase verificou-se que a metodologia desenvolvida e

utilizada nas fases anteriores não se revelava apropriada para alguns dos compostos responsáveis pelo aroma desenvolvido durante o envelhecimento dos vinhos.

Concretamente, a eficiência da fibra utilizada na SPME revelou-se reduzida para a análise de alguns ésteres de ácidos fixos e lactonas. Desta forma foi necessário utilizar uma metodologia tradicional de extracção líquido-líquido, com diclorometano.

Por fim, e de acordo com estudos de outros autores (Silva Ferreira, 1998) e dos resultados obtidos neste trabalho, optou-se por estudar a evolução de uma lactona, o sotolon, ao longo do envelhecimento dos vinhos Madeira.

2.2 A MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA ANÁLISE DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DO VINHO

A baixa concentração (da ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.L^{-1}) em que muitos dos compostos aromáticos se encontram nas amostras estudadas, faz com que seja necessário proceder à sua extracção e concentração antes da análise por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) ou por GC-MS.

Métodos como a extracção líquido-líquido (LLE) (Wada e Shibamoto, 1997; Ferreira *et al.*, 1993; Hardy, 1969), a microextracção líquido-líquido (LLME) (Ortega *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1993), a extracção líquido-líquido com ultrasons (us) (Cocito *et al.*, 1995), a destilação-extracção simultâneas (Nuñez e Behelmans, 1984), a extracção em fase sólida com a utilização de diferentes adsorventes porosos (López *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1996; Voirin *et al.*, 1992; Günata *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1982), a extracção por microondas (Razungles *et al.*, 1994), a extracção por fluido supercrítico (Blanch *et al.*, 1995), entre outras (Aznar *et al.*, 2003; López *et al.*, 2003; Aznar *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2000; López *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 1998), têm sido utilizados para isolar os componentes voláteis e aromáticos dos vinhos. Algumas desvantagens destes métodos são a fraca reprodutibilidade, a baixa eficiência de extracção e para todos eles a complexidade laboratorial (Etiévant, 1987).

A partir do início da década de 90, a microextracção em fase sólida (SPME) (Górecki *et al.*, 1999; Vás *et al.*, 1998; Eisert e Pawliszyn, 1997; Arthur e Pawliszyn,

1990) surge como uma alternativa aos métodos comumente utilizados, pois permite extrair e concentrar os analitos numa única etapa de um modo mais simples, rápido e menos laborioso.

Esta técnica utiliza uma pequena fibra de sílica fundida revestida com uma fase polimérica adsorvente para isolar os analitos (figura 2.1). Estes são absorvidos, ou adsorvidos (dependendo da natureza do revestimento), pela fase adsorvente até o sistema atingir o equilíbrio. A quantidade de analito extraída é determinada pela grandeza do coeficiente de partição do analito entre a matriz e a fase adsorvente.

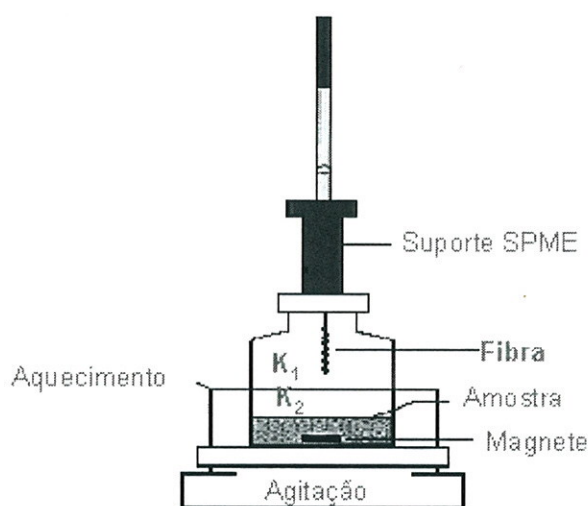


Figura 2.1 – Representação esquemática da microextração em fase sólida com espaço de cabeça (Jia et al., 1998).

Esta técnica pode ser efectuada em três modos básicos (Pawliszyn, 1999), dependendo dos analitos a extrair e do tipo de matriz : *extração directa*, *extração por espaço de cabeça* e *extração com protecção de membrana*.

No modo de *extração directa* a fibra é inserida directamente na amostra e os analitos são transportados directamente da matriz para a fase adsorvente. De modo a facilitar a difusão dos analitos é conveniente proceder à agitação da amostra.

No modo de *extração por espaço de cabeça* os analitos são extraídos da fase gasosa em equilíbrio com a amostra. Protege-se deste modo a fibra do efeito adverso causado por substâncias não voláteis e de peso molecular elevado presentes na matriz. Este modo permite também modificações de matriz, incluindo ajustes de pH, sem

afectar a fibra. É utilizado essencialmente para a extracção de substância voláteis e em menor escala semi-voláteis. A temperatura afecta significativamente a cinética da extracção porque determina a pressão de vapor dos analitos, daí a necessidade de um controlo rigoroso.

No versão *extracção com protecção de membrana* a fibra encontra-se separada da amostra através duma membrana selectiva, que permite a passagem dos analitos e bloqueia as interferências. O processo de extracção é substancialmente mais lento do que a extracção directa.

A SPME tem a vantagem de não necessitar de solventes orgânicos, não requer prévia preparação da amostra e tem a possibilidade de automatização (Arthur *et al.*, 1992). A sua aplicabilidade e aceitação é cada vez maior, mostrando-se muito eficiente na extracção de compostos orgânicos com diferentes volatilidades e polaridades em diversas matrizes ambientais (Brás *et al.*, 2000; Bao, *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 1992a), alimentares (Yang e Pepard, 1994) e biológicas (Garcia *et al.*, 1998). A sua aplicação na extracção de monoterpenóis (Garcia *et al.*, 1998a; Garcia *et al.*, 1998b), voláteis (Bencomo-Rodríguez, *et al.*, 2002; Bencomo-Rodríguez, *et al.*, 2002a; Lecanu *et al.*, 2002; Mestres *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1996; Steffen e Pawliszyn, 1996), e pesticidas (Correia *et al.*, 2000; Dugay *et al.*, 1998) nos vinhos, está ainda em desenvolvimento pois só recentemente começou a ser utilizada neste tipo de matrizes. Garcia *et al.*, (1998), utilizaram uma fibra de poliacrilato (PA-85µm) com um tempo de extracção de 60 minutos para análise dos componentes aromáticos voláteis em vinhos.

Tendo sido já aplicada a vinhos para determinação de diferentes componentes (Garcia *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998a; Garcia *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2000), não é conhecida até à data a aplicação da HS-SPME para a determinação de monoterpenóis em vinhos licorosos.

Sabendo que o efeito do etanol pode ser importante no processo de partição que ocorre entre a fibra e a amostra, torna-se importante otimizar e validar as condições que permitem o doseamento de compostos voláteis (monoterpenóis) em vinhos com teores alcoólicos de aproximadamente 18%.

Neste trabalho, com base nos estudos de Garcia *et al.*, (1998 e 1999) propusemo-nos desenvolver um método para análise de alguns monoterpenóis (linalol, α -terpineol, citronelol, nerol, geraniol, nerolidol e eugenol) e norisoprenóides (β -

damascenona, α -ionona e β -ionona), em mostos e vinhos de quatro das castas mais representativas da produção do vinho Madeira - *Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho*.

2.3 AMOSTRAS EM ESTUDO

A tabela 2.1 descreve resumidamente os objectos de estudo, as análises efectuadas e os métodos analíticos empregues bem como os objectivos a que se destinaram.

Tabela 2.1 Identificação dos objectos de estudo.

Amostras	Anos	Castas	Nomenclatura	Objectivos	Técnicas
UVAS (12 mostras)	2000 (3×4)	Boal Malvazia Sercial Verdelho	UB UM US UV	<ul style="list-style-type: none"> Estudo do perfil aromático; 	SPME (PA-85 μm)/ GC-MS
MOSTOS (36 amostras)	1998 (12) 1999 (12) 2000 (12)	Boal Malvazia Sercial Verdelho	MB MM MS MV	<ul style="list-style-type: none"> Quantificação dos compostos do aroma varietal (monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13}; Estrudo do perfil aromático; Aplicação da análise multivariável para discriminar as castas; 	SPME (PA-85 μm)/ GC-MS
VINHOS MONOARIETAIS (36 amostras)	1998 (12) 1999 (12) 2000 (12)	Boal Malvazia Sercial Verdelho	VB VM VS VV	<ul style="list-style-type: none"> Quantificação dos compostos do aroma varietal (monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13}; Estudo do perfil aromático; Aplicação da análise multivariável para discriminar as castas; 	SPME (PA-85 μm)/ GC-MS
VINHOS VELHOS (86 amostras)	1995 (20) 1990 (16) 1985 (12) 1980 (10) 1976 (8)	Boal Malvazia Sercial Verdelho	VB VM VS VV	<ul style="list-style-type: none"> Estudo da evolução do perfil aromático ao longo do envelhecimento; Comparação das técnicas analíticas. 	ELL com DCM/ GC-MS; SPME (PA-85 μm)/GC-MS

Em parêntesis figura o número de amostras recolhidas no ano respectivo

As uvas analisadas foram vindimadas manualmente no Campo Experimental (Ponta do Pargo) da Secretaria Regional da Agricultura, no ano de 2000, no dia da vindima de manhã.

Foram recolhidos, aleatoriamente, 4 a 5 cachos de algumas cepas, e transportados, devidamente acondicionadas em mala térmica, para o laboratório do Departamento de Química da Universidade da Madeira. Os bagos depois de separados do cacho pelo pedicelo, foram colocados em sacos de polietileno e congelados a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise posterior. Estas amostras visaram unicamente a comparação do perfil aromático entre as uvas e os mostos correspondentes.

Os mostos analisados foram obtidos no Instituto do Vinho da Madeira, durante o período da vindima/vinificação das uvas provenientes do Campo Experimental da Ponta do Pargo. Foram recolhidos imediatamente após o esmagamento das respectivas uvas, em frascos ambar de 100 ml, transportados para o laboratório do Departamento de Química da Universidade da Madeira e congelados a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à data da análise.

Após a vinificação destes mostos, que seguiu o processo 1 (bica aberta) descrito na introdução teórica (figura 1.8, *pág. 15*), os vinhos monovarietais resultantes foram transferidos para barris de madeira de carvalho de aproximadamente 250 litros, onde estagiaram durante 8 meses. Foram então recolhidos em garrafas de 0,75 litros, transportados para o laboratório do Departamento de Química da Universidade da Madeira e congelados a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ até á data da análise. Foram utilizados para a análise do perfil aromático e também para a caracterização sumária.

Os parâmetros relativos à caracterização sumária dos vinhos, °Brix, título alcoométrico adquirido, teores de açúcares redutores, acidez total, fixa e volátil, pH, teores de dióxido de enxofre livre e total, massa volúmica, e extracto seco não redutor e total, foram determinados através dos métodos recomendados pela OIV¹. As análises foram efectuadas no Laboratório do IVM.

Para o estudo do envelhecimento foram seleccionados 86 vinhos das castas em estudo, com idades compreendidas entre os 8 meses e os 25 anos. As condições de envelhecimento foram semelhantes para todos os vinhos: conservação em cascos de madeira de carvalho, ao abrigo da luz e do ar. Foram recolhidos em garrafas de 0,75 litros, transportados para o laboratório e congelados a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ até á data da análise.

¹ OIV: Office International de la Vigne et Vin.

2.4 CARACTERÍSTICAS DAS VINHAS

As características das vinhas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, no que se refere á idade, ao porta-enxerto, ao sistema de condução adoptado, à altura dos solo, à orientação das filas e ao compasso de plantação, encontram-se descritas na tabela 2.2.

Tabela 2.2 Características das vinhas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* (dados fornecidos pela Sr^a Eng^a Carlota Ferreira, IVM, Divisão de Viticultura).

Características	VB	VM	VS	VV
ano de instalação da vinha	1981	1979	1995	1981
porta-enxerto	R99	R99	R99	R99
sistema de condução	espaldeira	latada	espaldeira	espaldeira
altura ao solo /m	0,5	2,0	0,5	0,5
orientação das filas	Noroeste/Sudeste	Noroeste/Sudeste	Noroeste/Sudeste	Noroeste/Sudeste
compasso de plantação	1,8×1,0	2,1×1,8	1,8×1,0	1,8×1,0

2.5 REAGENTES E CONSUMÍVEIS

Todos os reagentes utilizados no trabalho experimental foram obtidos com o maior grau de pureza disponível e utilizados tal como foram fornecidos.

Os padrões dos monoterpenóis - linalol (lin), α -terpineol (ter), citronelol (cit), nerol (ner), geraniol (ger), nerilacetona (neril), e nerolidol (nero), dos norisoprenóides - β -damascona (dam), α -ionona (a-ion) e β -ionona (b-ion), foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Química, S.A., e utilizados sem prévia purificação (grau de pureza >98 % para a grande maioria dos compostos).

O padrão interno 3-octanol, utilizado na quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides em C₁₃ foi igualmente fornecido pela Sigma-Aldrich Química, S.A.

O cloreto de sódio (NaCl) de grau analítico, usado para ajuste da força iónica, e o sulfato de sódio anidro, foram fornecidos pela Merck (Darmstad, Germany).

Utilizou-se etanol e metanol (Merck, Darmstad, pureza >99,8 %) e água bidestilada, obtida por um sistema de purificação da Barnstead, E-Pure, de qualidade HPLC.

O diclorometano, p.a., foi fornecido pela Riedel-deHäen (Sigma-Aldrich, GmbH).

Todos os outros reagentes utilizados foram adquiridos á Merck, á Sigma-Aldrich e á LabScan.

O gás de arraste usado na técnica de cromatografia gasosa-espectrometria de massa foi o hélio N₆₀.

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1 Método analítico para a quantificação de monoterpenóis e outros compostos voláteis

2.6.1.1 Preparação dos padrões e amostras

Foi preparada uma solução padrão (solução mãe) dissolvendo os analitos puros em metanol. As concentrações dos analitos nesta solução foram as seguintes : linalol – 429,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, α -terpineol – 112,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, citronelol - 57,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, nerol - 43,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, geraniol - 43,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, nerilcetona - 86,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, nerolidol - 43,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, β -damascenona - 93,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, α -ionona - 77,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e β -ionona 77,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição, sempre que necessário, a partir da solução mãe.

Dada a diferença de concentrações destes compostos nos vinhos e a diferente sensibilidade do espectrómetro de massa para os compostos em estudo, optou-se por preparar a solução stock com concentrações diferenciadas, de modo que na construção da curva de calibração tivéssemos uma gama de concentrações que englobassem o teor destes compostos nos vinhos e nos mostos. Na tabela 3.1 (*pág. 108*) estão registados os compostos analisados bem como as gamas de concentração estudadas.

Para o estudo da linearidade, precisão, percentagem de recuperação e determinação dos limites de detecção, foram preparadas várias soluções de diferentes concentrações, em solução hidroalcoólica a 18% para a aplicação do método aos vinhos, e em solução aquosa para a aplicação do método aos mostos.

Às amostras (10 ml de vinho ou de mosto decantado) juntaram-se 3 g de NaCl tendo-se agitado durante 5 minutos, findos os quais se adicionou 20 μ l de solução metanólica de 3-octanol (padrão interno) a 10 mg.L⁻¹.

2.6.1.2 Procedimento SPME

As fibras para a microextração em fase sólida (PDMS, PDMS/DVB, Car/PDMS e PA-85 μ m) e o respectivo suporte usados neste trabalho, foram fornecidas pela Supelco (Bellefonte, PA, USA). Efectuou-se um condicionamento de cada fibra antes da sua utilização de acordo com as instruções do fornecedor. Foram efectuados brancos antes das análises para assegurar a ausência de contaminantes que pudessem interferir no processo analítico e/ou identificar as possíveis impurezas. Durante a extração foi utilizada uma placa de agitação/aquecimento Corning (Supelco) para agitar e aquecer as amostras possibilitando uma melhor difusão dos analitos da fase aquosa para o espaço de cabeça.

A quantidade de amostra (2,4 ml) colocada nos vials (4 ml), satisfaz a condição da razão das fases $1/\beta=0,6$, que de acordo com Garcia *et al.*, (1998) é considerada óptima para a extração por espaço de cabeça (HS)². Na fase da optimização variou-se o tipo de fibra, o tempo e a temperatura de extração, o teor de NaCl e o pH. Na fase de validação do método a fibra usada foi a de poliacrilato 85 μ m (PA-85 μ m), o tempo de extração usado foi de 60 minutos para os mostos e de 120 minutos para os vinhos, com uma agitação de 1250 rpm (agitador magnético, coberto com PTFE, 10 \times 30 mm) a uma temperatura de 40 °C. O teor de NaCl foi de 30 % em qualquer das soluções e o pH foi o original do vinho e do mosto. Finda a extração, a fibra foi inserida manualmente, durante 6 minutos no injector do cromatógrafo onde é aquecida a 260 °C para uma eficiente dessorção dos analitos, os quais são separados e analisados por GC-MS.

Quer as amostras quer as soluções padrão foram analisadas em triplicado, com excepção do estudo da precisão para o qual foram efectuadas seis extrações.

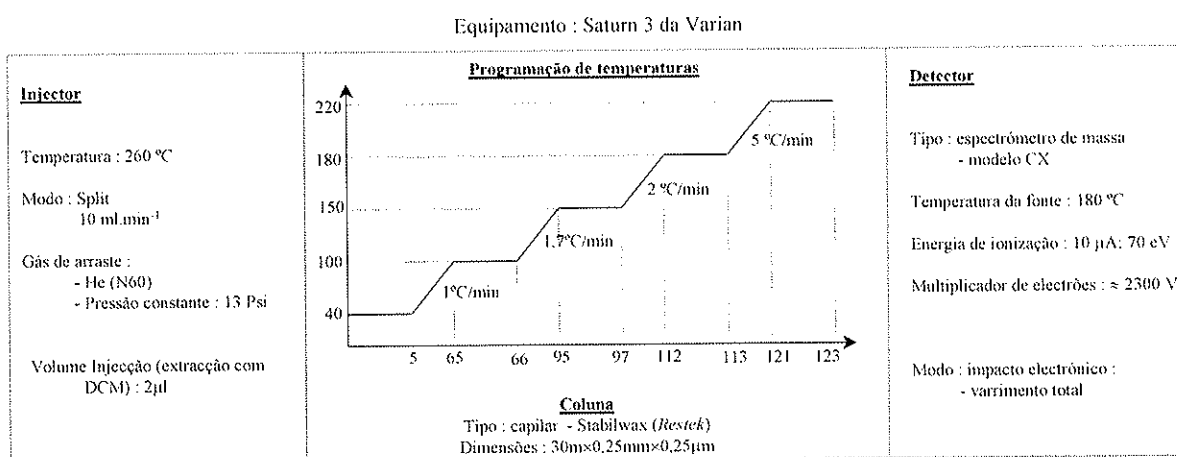
² Do inglês : Headspace (HS)

2.6.1.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas dos extractos foram efectuadas num sistema GC-MS constituído por um cromatógrafo gasoso Varian 3400 CX, Serie II, e por um espectrómetro de massas de armadilha de iões Varian Saturn II. Como gás de arraste foi utilizado o He N₆₀ (Air Liquide) com uma pressão á cabeça da coluna 100 kPa (13 psi) conferindo um fluxo de, aproximadamente, 1 mL.min⁻¹. A coluna capilar utilizada foi uma Stabilwax (30m×0,25mm×0,25 µm) da Restek.

De modo a optimizarmos a resolução, foi utilizado o programa de temperaturas representado no quadro I. A temperatura do injectore foi de 260 °C para a fibra PA-85µm e Car-PDMS, e de 250 °C para as fibras de PDMS e PDMS/DVB. A temperatura da linha de transferência foi mantida a 220 °C e a da fonte de iões a 180 °C.

Quadro I – Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos compostos aromáticos da fracção livre das uvas, dos mostos e dos vinhos Madeira.



Todas as análises foram efectuadas no modo *scan* com ionização por impacto electrónico. A energia de ionização foi de 10 µA (70 eV), o tempo de ionização de 25000 µs, a modulação axial foi, em média, 5 V, e o multiplicador 2300 V. Os espectros foram adquiridos numa gama de massa de 30-300 m/z, sendo o background ajustado á massa de 35 e com um tempo de atraso de 1 minuto.

2.6.1.4 Identificação e quantificação dos compostos

A identificação dos monoterpenóis e dos outros compostos em estudo foi efectuada por comparação dos espectros de massas obtidos com os dos padrões puros e com os da biblioteca NIST 92 instalada no equipamento. Foram também identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os de misturas padrão dos terpenóis e norisoprenóides.

Os analitos foram quantificados através do método do padrão interno (octan-3-ol), usando curvas de calibração com padrões extraídos por HS-SPME nas mesmas condições que as amostras. No entanto, tendo em consideração o efeito do etanol na percentagem de extracção, para a quantificação dos mostos foram usadas curvas de calibração com padrões em solução aquosa e para os vinhos foram usadas curvas de calibração com padrões em solução etanólica a 18%.

2.6.2 Método analítico para o estudo do perfil aromático das uvas, mostos e vinhos

2.6.2.1 Preparação das amostras

Análise de uvas: após descongelação pesaram-se, num erlenmeyer, 50 g de uvas de cada umas das castas estudadas. Foram cortadas e colocadas num frasco de congelação de 50 ml adaptado para a microextração em fase sólida por espaço de cabeça. Adicionaram-se 15 g de cloreto de sódio (30 %) e 100 µl de solução metanólica de octan-3-ol (padrão interno) a 10 mg.L⁻¹.

Análise dos vinhos e mostos: a 10 ml de vinho ou de mosto previamente decantado, juntaram-se 3 g de NaCl tendo-se agitado durante 5 minutos, findos os quais se adicionou 20 µl de solução metanólica de octan-3-ol (padrão interno) a 10 mg.L⁻¹.

2.6.2.2 Procedimento SPME

Após a fase de validação definida no método anterior, foram utilizadas as condições HS-SPME optimizadas descritas no quadro II (*pág. 107*) para os mostos e vinhos. Para as amostras das uvas preparadas como descrito em 2.6.2.1, optou-se por um tempo de extracção idêntico ao dos mostos, ou seja 60 minutos, mantendo-se todos os outros parâmetros de validação descritos no quadro II.

As condições cromatográficas utilizadas são as descritas em 2.6.1.3 e sumariadas no quadro I (*pág. 95*).

A identificação dos compostos aromáticos da fracção livre das uvas, dos mostos e dos vinhos das diferentes castas em estudo, foi efectuada com recurso ao programa Saturn versão 5.2 (Varian), por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca NIST 92 instalada no equipamento e com os dos compostos puros quando disponíveis.

2.6.3 Métodos analíticos para o estudo dos compostos voláteis ao longo do envelhecimento

A evolução dos compostos voláteis ao longo do envelhecimento foi avaliada pela utilização de duas técnicas de extracção – microextração em fase sólida com fibra de poliacrilato (HS-SPME) e extracção líquido-líquido utilizando como solvente extractor o diclorometano (DCM). A extracção por HS-SPME foi efectuada a 36 vinhos: 12 vinhos monovarietais (3 de cada casta) de 2000, 12 vinhos de 1990 (3 de cada casta) e 8 vinhos de 1976 (2 de cada casta), fornecidos pelo IVM e pela MWC. A extracção com DCM foi efectuada a 86 amostras de vinhos das castas em estudo, fornecidos pelo IVM (40 amostras) e pela MWC (46 amostras), com idades compreendidas entre os 8 meses e os 25 anos (tabela 2.1).

Este processo permitiu-nos, por um lado, comparar os perfis aromáticos dos vinhos novos relativamente aos vinhos velhos e, por outro, comparar a eficiência das duas técnicas de extracção.

2.6.3.1 Preparação das amostras

A 50 ml de vinho juntaram-se 50 μ l de uma solução hidroalcoólica (1:1, v/v) de octan-3-ol a 422 mg.L⁻¹ como padrão interno e 5 g de sulfato de sódio anidro. Extraíu-se, sucessivamente, com duas alíquotas de 5ml de DCM.

Em cada extracção a mistura foi agitada durante 5 minutos, com auxílio de um agitador magnético. A velocidade de rotação foi de 1250 rpm. Recolheram-se e misturaram-se as duas fases orgânicas. Uma vez desidratado com sulfato de sódio anidro e concentrado (1:5) sob corrente de azoto, o extracto foi injectado no sistema cromatográfico (2 μ l).

As condições cromatográficas são idênticas às descritas em 2.6.1.3 e sumariadas no quadro I.

A identificação dos compostos voláteis dos vinhos das diferentes castas em estudo, foi efectuada por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca NIST 92 instalada no equipamento e com os dos compostos puros quando disponíveis.

2.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Todos os métodos estatísticos empregues neste trabalho, como a análise de variância, análise de componentes principais e análise discriminante linear, foram efectuados com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão para Windows 11.0, 2002.

Capítulo

3

Resultados e Discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo proceder-se-á à exposição e discussão dos resultados analíticos obtidos para cada grupo de compostos químicos e para cada uma das castas nobres, nas três vindimas estudadas.

Inicialmente apresentam-se os resultados da optimização e validação do método analítico utilizado na extracção e quantificação da fracção livre dos monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13} , a microextracção em fase sólida com espaço de cabeça HS-SPME.

Apresentar-se-ão os resultados da aplicação do método à análise dos terpenóis livres aos mostos e aos vinhos monovarietais correspondentes, comparando os mesmos nas três vindimas efectuadas. O mesmo se fará relativamente a outros grupos químicos.

Os resultados referentes à evolução de compostos voláteis ao longo do envelhecimento serão apresentados na secção 3.8 e 3.9.

Por fim, proceder-se-á a um estudo por análise multivariável, com a finalidade de avaliar a possibilidade de diferenciação entre as diferentes castas de vinhos Madeira estudados.

3.1 OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE

Estudaram-se as condições óptimas para a microextracção em fase sólida por espaço de cabeça (HS-SPME) usando soluções aquosas de monoterpenóis e norisoprenóides para referenciar os mostos, soluções etanólicas a 18 % para referenciar os vinhos e amostras de mostos e vinhos fortificadas com os compostos em estudo.

Foram optimizados factores com influência no processo extractivo como: o *tipo de fibra*, a *temperatura de extracção*, o *tempo de extracção*, o *tempo e temperatura de*

dessorção, a força iónica e o pH. Uma vez fixadas as condições óptimas de análise, foram avaliados os parâmetros de validação da metodologia analítica: a precisão, a exactidão, a gama linear e os limites de detecção e quantificação do método.

Foi usada uma solução padrão obtida por diluição de 1:2 da solução mãe descrita em 2.5.1.1 (pág. 92).

3.1.1 Selecção do tipo de fibra

Com a finalidade de seleccionarmos a fibra mais adequada aos compostos estudados, foram avaliadas e comparadas quatro fibras de microextracção em fase sólida, disponíveis comercialmente, diferindo no revestimento da fase adsorvente [100 μm polidimetilsiloxano (PDMS); 65 μm polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB); 75 μm carboxeno-polidimetilsiloxano (Car/PDMS) e 85 μm poliacrilato (PA-85)]. Os resultados do estudo comparativo das fibras são mostrados na figura 3.1.

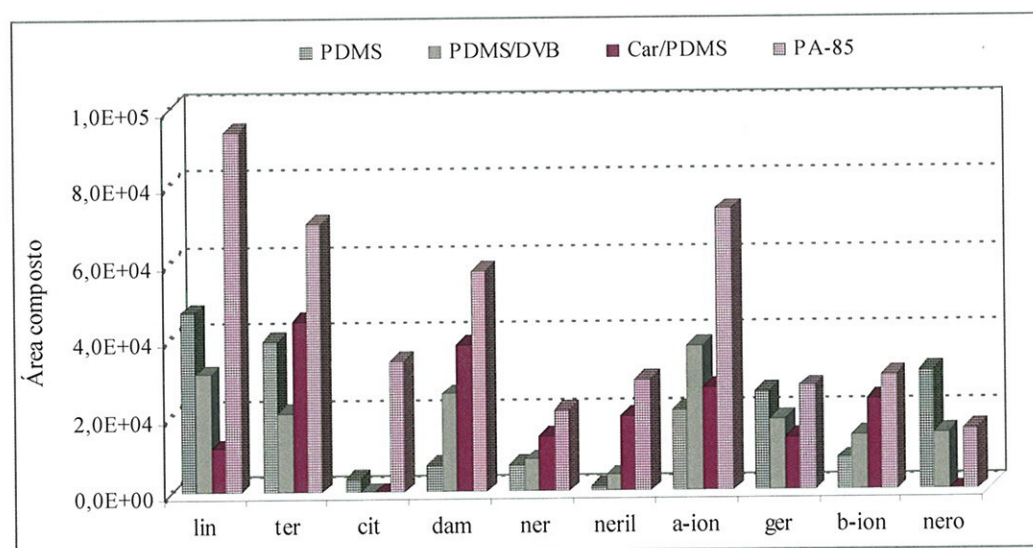


Figura 3.1 - Comparação da eficiência de extração dos monoterpénóis e norisoprenóides em solução aquosa por HS-SPME usando diferentes fibras. O volume de amostra foi de 2,4 ml com 30 % de NaCl, o tempo de extração de 60 min. e a temperatura de extração de 40 °C.

Legenda: lin- linalol; ter- α -terpineol; cit- citrionelol; dam- β -damascenona; ner- nerol; neril- nerilacetona; a-ion- α -ionona; ger- geraniol; b-ion- β -ionona; nero- nerolidol.

Tal como esperado, atendendo à reduzida polaridade das fibras PDMS e PDMS/DVB estas revelaram-se pouco eficientes para a maioria dos compostos em estudo. A Car/PDMS embora se mostre mais eficiente que as anteriores, origina cromatogramas cujos picos apresentam um *tailing* muito significativo. Provavelmente este facto deve-se à dificuldade na dessorção dos analitos em estudo.

A fibra mais adequada, e portanto a utilizada nos estudos posteriores da optimização e validação, foi a de poliacrilato, PA-85 μ m, por apresentar boa afinidade para a maioria dos analitos de interesse.

À excepção do nerolidol cuja eficiência de extracção é ligeiramente superior com a fibra PDMS, todos os outros compostos apresentam maior afinidade para a fibra de poliacrilato (PA-85 μ m).

3.1.2 Efeito da temperatura de extracção

Para determinar a temperatura óptima de extracção, foram estudadas três temperaturas: 28, 40 e 60 °C (figura 3.2).

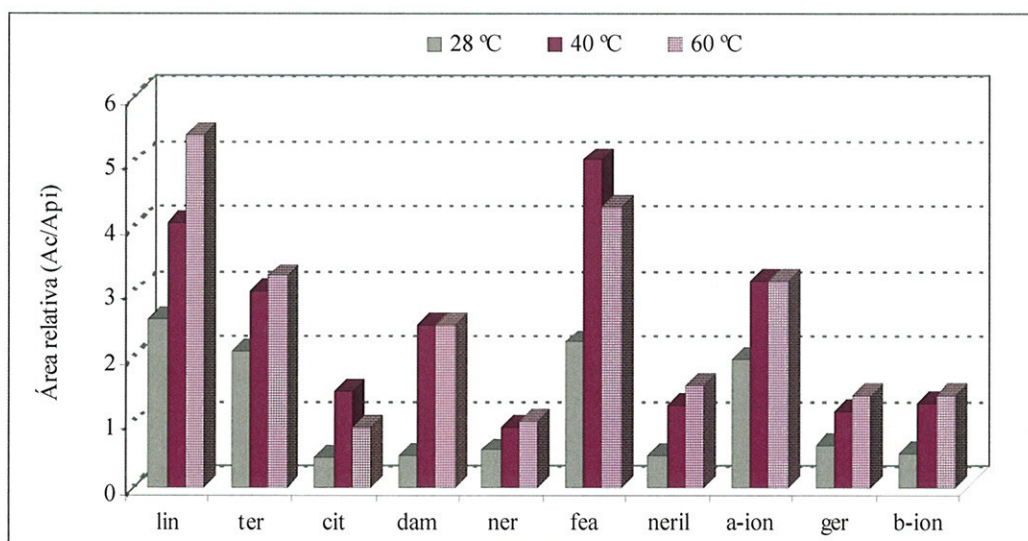


Figura 3.2 - Efeito da temperatura na eficiência da extracção dos monoterpénis e norisoprenóides em solução aquosa por HS-SPME com fibra de poliacrilato (PA-85 μ m). O tempo de extracção foi de 60 min. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Verificou-se um aumento das áreas dos picos com o aumento d temperatura. Apesar de a 60 °C as áreas serem ligeiramente superiores às obtidas com a temperatura de 40 °C, a diferença não é significativa pelo que se optou pela temperatura de 40 °C para os estudos a efectuar. Previne-se deste modo a eventual degradação dos analitos, nomeadamente os mais termolábeis.

3.1.3 Efeito do tempo de extracção

Estudaram-se os perfis dos tempos de extracção entre os 5 e os 60 minutos para a solução aquosa (figura 3.3 - A), e entre os 5 e os 240 minutos para a solução etanólica a 18 % (figura 3.3 – B). A figura 3.3 ilustra os perfis da cinética de extracção para os compostos estudados.

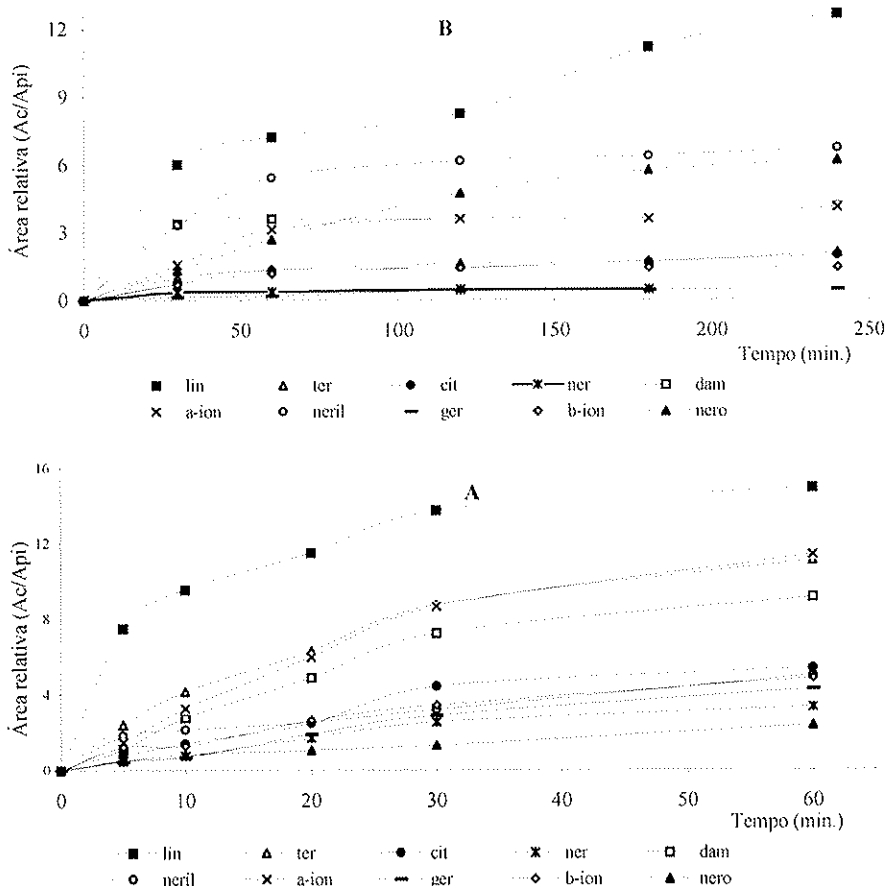


Figura 3.3 - Perfis da cinética de absorção para os compostos estudados por HS-SPME utilizando uma fibra de PA-85µm, A – solução aquosa, B – solução etanólica a 18 %. A temperatura de absorção foi de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Além de outros factores, o tempo necessário para atingir o equilíbrio depende da polaridade e da massa molecular relativa do analito. Para os compostos menos polares o equilíbrio de extracção é atingido rapidamente, enquanto que para os de maior polaridade a absorção é mais lenta. Verificou-se também que a cinética de extracção é relativamente rápida nos primeiros 30 minutos tornando-se mais lenta a partir deste instante. A extracção é considerada completa, quando se atinge o equilíbrio entre o analito e a fibra. O tempo de equilíbrio depende, essencialmente, do tipo de analito, da matriz, do modo de amostragem e da fibra.

Com base nas curvas dos perfis da cinética de extracção mostradas na figura 3.3, escolheu-se um tempo de extracção de 60 minutos para os mostos e de 120 minutos para os vinhos, dado fornecerem uma extracção considerada adequada e permitirem que o processo de extracção (HS-SPME) se efectue no mesmo tempo que o requerido para análise por GC-MS (120 minutos). Este é inferior ao utilizado por Garcia *et al.*, (1998a), cujo tempo de amostragem usado foi de 180 minutos mas a uma temperatura de 25 °C.

3.1.4 Temperatura e tempo de dessorção

A temperatura de dessorção deverá ser suficientemente elevada para libertar a totalidade dos compostos absorvidos. Para a fibra de PA-85µm utilizou-se uma temperatura de 260 °C. De modo a determinarmos o tempo de dessorção, os compostos em estudo foram dessorvidos a 260 °C durante 1, 3 e 6 minutos. Tendo sido detectados analitos após a segunda dessorção, concluiu-se que seria desejável um tempo de extracção superior para permitir uma melhor sensibilidade na análise, tendo-se optado por 6 minutos.

3.1.5 Efeito da força iónica

A aplicabilidade da HS-SPME depende da transferência do analito da fase aquosa para a fase gasosa. Para compostos como os álcoois, aldeídos, cetonas e monoterpenóis, altamente solúveis em água, a transferência de massa da amostra para o

espaço de cabeça poderá ser a etapa determinante do processo. A adição de sal pode baixar significativamente a solubilidade dos compostos em solução aquosa, resultando um aumento da concentração dos compostos em estudo no espaço de cabeça (Pozo-Bayón *et al.*, 2001; Yang e PEPARD, 1994; Arthur *et al.*, 1992).

Para averiguar o efeito da força iónica, foram analisadas soluções padrão dos compostos estudados com diferentes teores de cloreto de sódio (NaCl) 0, 10 e 20 % (m/v) (soluções não saturadas), 30 e 40 % (m/v) (soluções saturadas). A figura 3.4, mostra o efeito da adição NaCl na eficiência de extracção dos monoterpénóis por HS-SPME.

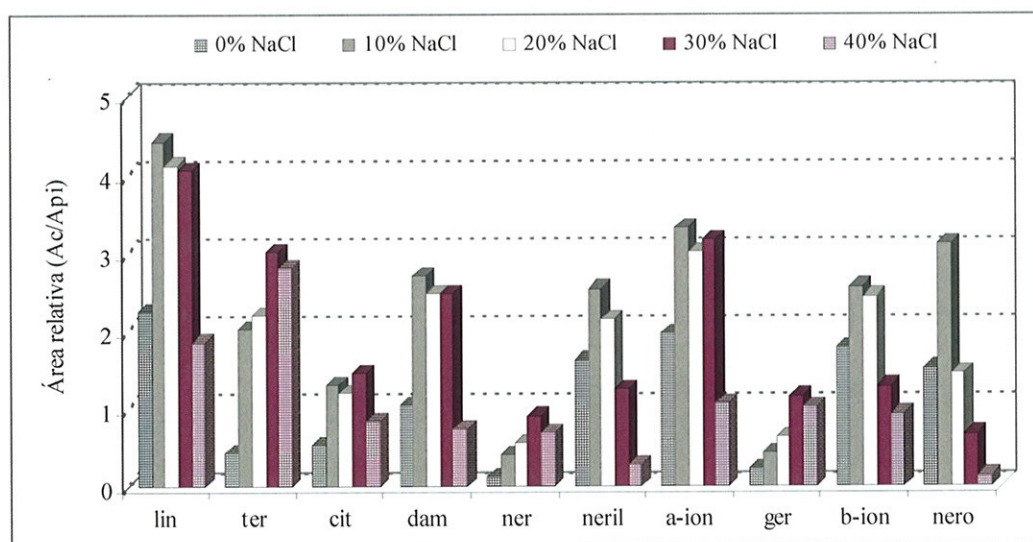


Figura 3.4 - Efeito da força iónica na eficiência de extracção dos compostos estudados por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85 μ m, numa solução etanólica a 18 %. O tempo de extracção foi de 120 minutos à temperatura de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Relativamente à solução aquosa verificou-se, para a maioria dos compostos, um aumento significativo na eficiência da extracção dos 0 aos 30 % de NaCl, diminuindo dos 30 aos 40 % para todos os compostos estudados. Para a solução etanólica a 18 %, a percentagem de extracção do linalol, do α -terpineol, da β -damascenona e do nerolidol, aumenta significativamente quando se passa dos 0 aos 10 % de NaCl. O nerolidol é o composto cuja eficiência de extracção é maior para um teor de NaCl de 10 %, enquanto

que o α -terpineol, citrionelol, nerol e geraniol são mais eficientemente extraídos com um teor de NaCl de 30 %.

Perante este comportamento irregular, optou-se por uma solução de compromisso que corresponde à adição de NaCl a 30 % quer para a análise dos mostos quer para a análise dos vinhos.

3.1.6 Efeito do pH

Para avaliarmos o efeito do pH preparou-se uma solução de monoterpénis e norisoprenóides em solução etanólica a 18 %, com valores de pH de 1,2; 2,7; 3,9 e 5,9. A figura 3.5 mostra os resultados obtidos.

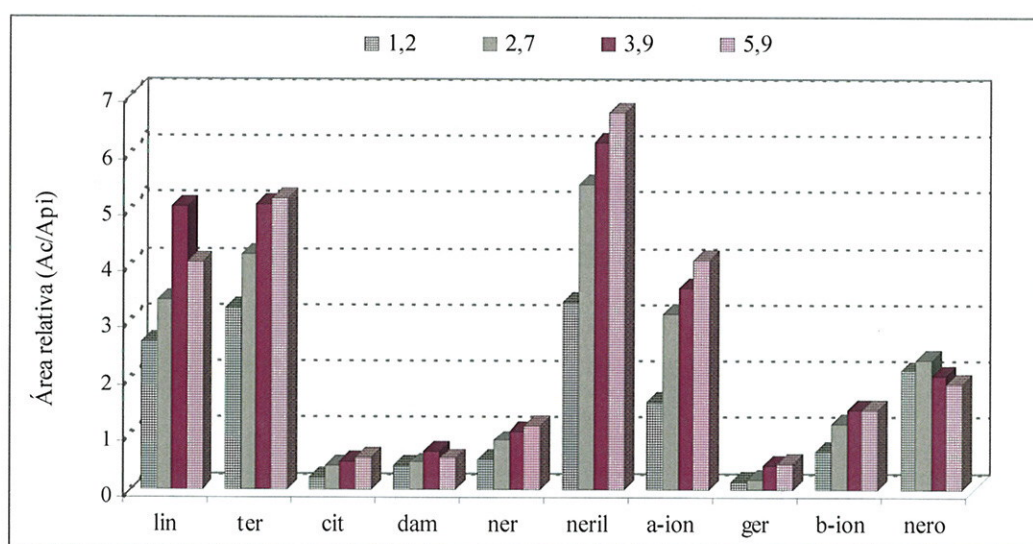


Figura 3.5 - Efeito do pH na eficiência de extração dos monoterpénis e norisoprenóides em solução etanólica a 18 % por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85 μ m. O tempo de extração foi de 120 min. e a temperatura de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Como podemos verificar para a maioria dos compostos não existem diferenças significativas para os diferentes valores de pH estudados.

Para o linalol, β -damascenona e β -ionona, o valor de pH mais apropriado é 3,9. No entanto, mesmo para estes valores de pH os resultados não são significativamente

diferentes, pelo que optámos por realizar todos os ensaios ao valor de pH encontrado nos mostos e vinhos, ou seja 3,0-3,5.

3.1.7 Efeito do teor de etanol

É reconhecido o efeito do etanol como co-solvente neste tipo de extracção (Pozo-Bayón *et al.*, 2001; Brás *et al.*, 2000; Urruty e Montury, 1996). Tendo em conta a necessidade de dosear amostras com diferentes teores alcoólicos, mostos e vinhos a 18%, estudou-se o efeito deste parâmetro.

Efectuaram-se extracções, em triplicado, dos monoterpénóis e norisoprenóides em solução alcoólica a 0, 5, 12 e 18 % (v/v), numa gama de concentrações normalmente encontradas nos vinhos, de acordo com o procedimento descrito (2.6.1.1, *pág.* 93). Na figura 3.6, representam-se os resultados obtidos.

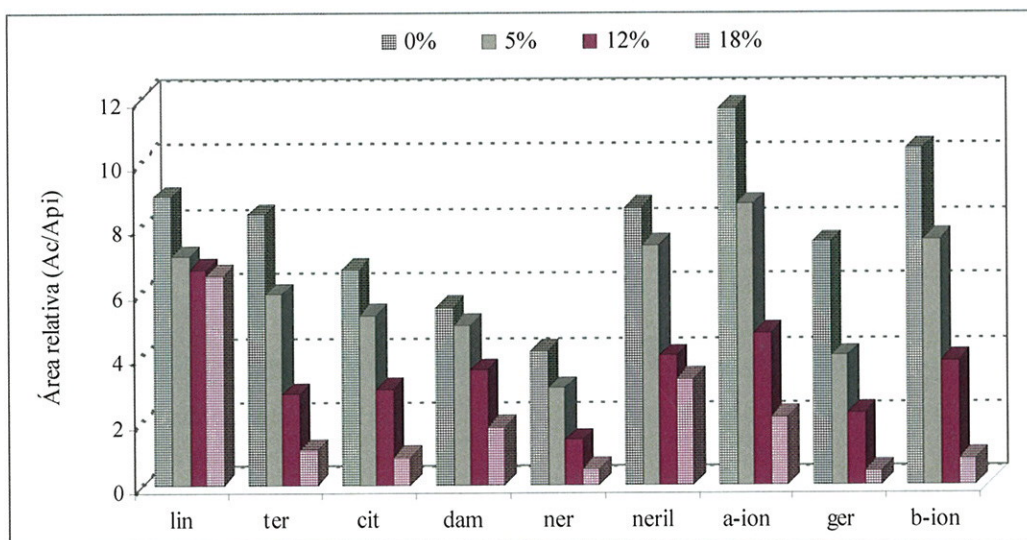


Figura 3.6 - Efeito da concentração de etanol na eficiência de extracção dos compostos estudados por HS-SPME, usando uma fibra de PA-85 μ m. O tempo de extracção foi de 120 min. e a temperatura de absorção de 40 °C. (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Verificou-se que o equilíbrio é dependente da natureza do analito e da concentração do etanol. É notória uma diminuição na eficiência da extracção com o

aumento do teor de etanol para os compostos estudados, com particular relevância para a α -ionona, a β -ionona, o α -terpineol e o geraniol.

Para o linalol, a eficiência da extração é pouco influenciada pela concentração de etanol presente.

Na quantificação para ter em conta este efeito, usaram-se curvas de calibração corrigidas em solução aquosa e etanólica a 18 % para os mostos e vinhos, respectivamente.

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A metodologia desenvolvida aplica-se à análise de monoterpenóis e norisoprenóides em uvas, mostos e vinhos. Considerando os resultados obtidos para a optimização da HS-SPME, adoptámos as condições analíticas descritas no quadro II, quer na validação do método analítico quer na aplicação do método às uvas, aos mostos e aos vinhos estudados.

O tempo de análise utilizado (60 minutos para as uvas e mostos, e 120 minutos para os vinhos) apesar de extenso, parece-nos o mais adequado se considerarmos os resultados obtidos, permitindo adequar o tempo de amostragem da HS-SPME ao tempo necessário à análise cromatográfica. Garcia *et al.*, (1998) usaram um tempo de amostragem de 180 minutos para determinar compostos voláteis em vinhos.

Quadro II – Condições utilizadas na microextração em fase sólida com espaço de cabeça (HS-SPME) dos compostos aromáticos da fracção livre das uvas, mostos e vinhos Madeira.

Parâmetros HS-SPME	
tipo de fibra	poliacrilato (PA-85 μ m)
volume de amostra	2,4 ml
temperatura de extração	40 °C
tempo de absorção	60 min. (solução aquosa); 120 min. (solução etanólica)
teor de NaCl	30 %
pH	3,0-3,5
temperatura de dessorção	260 °C
tempo de dessorção	6 min.

O tempo de análise, relativamente longo, necessário para cada amostra, é um compromisso entre a necessidade de uma separação cromatográfica que permita a melhor quantificação de todos os compostos e a necessidade de um método analítico suficientemente rápido, que permita a análise de um grande número de amostras.

3.2.1 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do cálculo da precisão intermédia (tabela 3.1) - mesmo método e operador, mesmo equipamento em 3 dias diferentes - para uma solução aquosa e hidroalcoólica dos compostos analisados.

Os resultados, expressos como desvio padrão relativo, RSD, obtido para seis medidas independentes da mesma solução padrão de monoterpenóis, variaram entre um máximo de 14,4 % para o nerolidol e um mínimo de 2,5 % para o citrionelol.

Para a solução alcoólica, os valores obtidos para a precisão intermédia foram similares, variando entre 14,2 % para o nerolidol e 4,8 % para o citrionelol. A precisão média obtida foi de 8,1 % para a solução aquosa e 8,8 % para a solução hidroalcoólica a 18 %.

Tabela 3.1 *Parâmetros de validação da metodologia analítica para a extracção dos analitos estudados em solução aquosa (sol. aq.) e em solução etanólica a 18 % (v/v) (EtOH 18 %) por HS-SPME (fibra PA-85µm, 2,4 ml de amostra; $t_{ext.}=60$ e 120 min. para a solução aquosa e etanólica, respectivamente; $T_{ext.}=40$ °C; $t_{dessorção}=6$ min.; $T_{dessorção}=260$ °C).*

Composto	t_r (min)	Gama de Conc.(µg.L ⁻¹)	r^2		Limite de detecção (µg.L ⁻¹)		IP ^a (RSD %)	
			sol. aq	EtOH 18%	sol. aq	EtOH 18%	sol. aq	EtOH 18%
linalol	46,63	2,2 – 68,7	0,9996	0,9742	2,0	3,0	5,1	5,6
α-terpineol	61,29	0,6 – 18,0	0,9829	0,9966	2,5	2,9	7,2	6,5
citrionelol	69,66	0,2 – 9,2	0,9959	0,9899	0,3	1,6	2,5	4,8
β-damascenona	72,60	0,4 – 10,5	0,9829	0,9971	0,8	0,4	8,5	12,1
nerol	72,05	0,4 – 14,9	0,9908	0,9986	1,3	1,5	9,2	13,7
nerilacetona	74,93	0,8 – 20,8	0,9938	0,9902	0,4	2,6	9,6	5,9
α-ionona	75,66	0,7 – 12,2	0,9993	0,9930	0,4	2,0	11,8	5,6
geraniol	77,98	0,4 – 7,0	0,9976	0,9943	1,4	1,5	11,7	6,3
β-ionona	84,32	0,9 – 15,2	0,9962	0,9973	1,3	2,1	8,5	14,1
nerolidol	92,15	0,4 – 10,5	0,9770	0,9887	1,4	1,5	14,4	14,2

^aIP – Precisão intermédia (n=6)

A repetibilidade - mesmo método e operador, mesmo equipamento, no mesmo dia - calculada para três extracções réplicas de um mesmo mosto, foi em média, 4,8 %, com um máximo de 9,5 % para o geraniol e um mínimo de 0,4 % para a nerilacetona. Para o vinho a repetibilidade foi em média de 8,3 %, com um máximo de 22,2 % para o citrionelol e um mínimo de 1,9 % para o nerolidol.

3.2.2 Exactidão

A exactidão do método foi avaliada através do cálculo da percentagem de recuperação, obtida por adição de uma determinada quantidade dos compostos estudados a uma amostra de mosto *Verdelho* e do vinho correspondente.

Os resultados obtidos pelo método da adição de padrão encontram-se sumariados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Comparação entre as percentagens de recuperação em mostos e vinhos fortificados com uma solução padrão dos compostos estudados, obtidas com as condições dos quadros I e II (fibra PA-85, 2,4 ml de amostra, $t_{ext.}=60$ e 120 min. para mostos e vinhos, respectivamente; $T_{ext.}=40$ °C; $t_{dessorção}=6$ min.; $T_{dessorção}=260$ °C).

Composto	<i>mosto</i> (n = 6)		<i>vinho</i> (n = 6)	
	adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%recuperação \pm CV(%)	adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% recuperação \pm CV(%)
linalol	8,6	86,4 \pm 4,0	34,4	99,8 \pm 14,5
α -terpineol	2,3	43,2 \pm 5,4	9,0	90,8 \pm 7,7
citrionelol	1,2	105,5 \pm 4,1	4,6	102,5 \pm 22,2
β -damascenona	1,9	71,9 \pm 2,0	7,5	49,6 \pm 3,1
nerol	1,9	117,9 \pm 2,9	7,0	124,4 \pm 4,7
nerilacetona	3,5	76,6 \pm 1,9	6,9	89,9 \pm 5,1
α -ionona	1,6	106,7 \pm 3,4	6,2	115,9 \pm 6,5
geraniol	1,9	98,5 \pm 8,7	3,5	81,4 \pm 2,6
β -ionona	3,8	11,1 \pm 4,6	7,6	74,7 \pm 4,6
nerolidol	1,8	103,5 \pm 0,2	3,5	31,5 \pm 1,9

A percentagem de recuperação média foi de 83,2 \pm 30,3 % para os mostos e de 71,3 \pm 29,7 % para os vinhos. Estas percentagens de recuperação obtidas para as 6

determinações independentes, podem considerar-se adequadas para um método analítico de rotina, com exceção da β -damascenona e nerolidol que apresentam percentagens de recuperação inferiores a 50 %.

3.2.3 Linearidade e limites de detecção

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas de calibração a cinco níveis, cobrindo a gama de concentrações dos compostos usualmente encontradas neste tipo de amostras.

A figura 3.7, mostra as curvas de calibração obtidas para alguns dos compostos estudados.

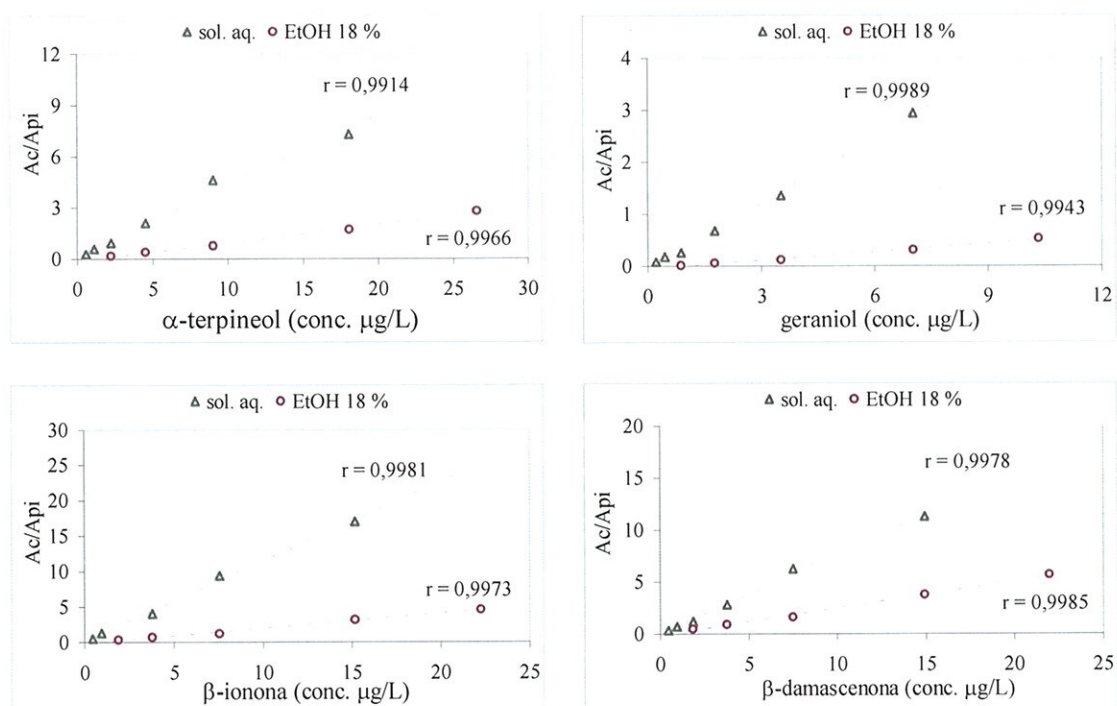


Figura 3.7 – Curvas de calibração resultantes da extração por HS-SPME de alguns dos compostos estudados em solução aquosa (sol. aq.) e em solução etanólica a 18 % (EtOH 18 %) (Ac/Api – área do composto/área do padrão interno).

Para a maioria dos compostos estudados, as curvas de calibração obtidas mostram que existe uma boa linearidade na gama de concentrações estudada, com

valores do coeficiente de correlação entre 0,9770 e 0,9996 para a solução aquosa e entre 0,9855 e 0,9986 para a solução etanólica a 18 % (tabela 3.1).

Os limites de detecção (LOD) constantes na tabela 3.1, foram determinados considerando a definição usual: *a concentração que origina, para cada composto, um sinal igual a três vezes o desvio padrão do branco*, ou seja, $3*s_{y/x}/b$, em que $s_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão do branco e b ao declive da recta de regressão.

Em termos de linearidade, os coeficientes de correlação obtidos para a solução aquosa e para a solução etanólica a 18 % são similares, verificando-se no entanto, que o declive é bastante superior para a solução aquosa.

3.2.4 Quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos e nos vinhos monovarietais

A quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides (terpenóis) nos mostos e nos vinhos monovarietais correspondentes por HS-SPME, foi uma das fases determinantes da realização deste trabalho, porque como compostos varietais que são, poderão servir de base para a diferenciação pretendida.

A quantificação foi feita recorrendo à construção de curvas de calibração a cinco níveis, com os padrões extraídos utilizando as mesmas condições analíticas que as amostras.

A metodologia desenvolvida que permite, para além dos monoterpenóis a análise de um grande número de compostos de diferentes famílias químicas, tem uma duração de 60 minutos no caso dos mostos e 120 minutos para os vinhos, para a extração por HS-SPME. A resposta da espectrometria de massa foi linear para os monoterpenóis na gama de concentrações estudadas (tabela 3.1).

Na figura 3.8, apresentam-se os cromatogramas de iões seleccionados (SIM, $m/z=93+121+136$) dos terpenóis, obtidos com as condições experimentais dos quadros I e II, de uma amostra de mosto *Verdelho* (A) e do vinho monovarietal correspondente (B), referentes à vindima de 2000.

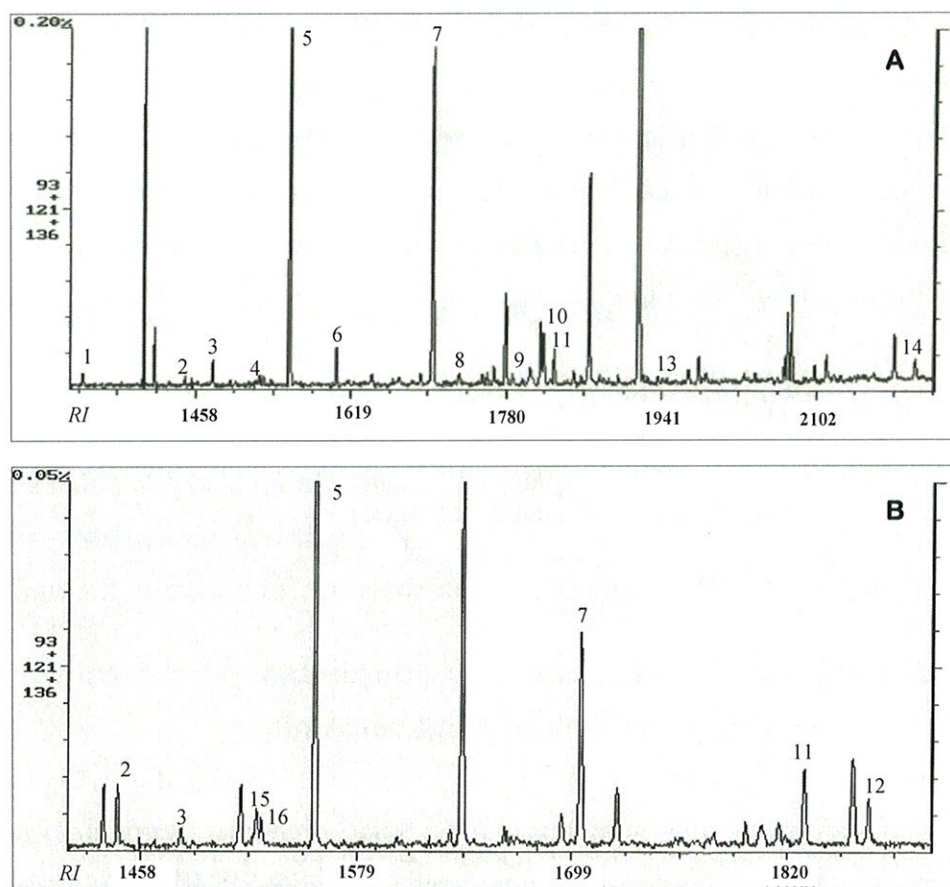


Figura 3.8 - Extractos de cromatogramas SIM (iões de $m/z=93+121+136$) de uma amostra de mosto Verdejo –A, e do vinho monovarietal correspondente –B, da vindima de 2000, obtido de acordo com as condições dos quadros I e II; (RI: índice de retenção).

Legenda: 1- Des 1; 2- *trans*-óxido de linalol; 3- *cis*-óxido de linalol; 4- (*E,E*)-farnesal; 5- linalol; 6- *terpine*-4-ol; 7- α -*terpineol*; 8- *neral*; 9- *citronelol*; 10- *nerol*; 11- β -*damascenona*; 12- *geraniol*; 13- β -*ionona*; 14- *farnesol*; 15- *vitispirano I*; 16- *vitispirano II*.

No geral, o método mostrou-se fiável e com bons parâmetros de validação para os objectivos pretendidos. Há no entanto alguns aspectos menos positivos associados a esta metodologia.

Um deles prende-se com o facto da microextração em fase sólida ser um processo competitivo. Como tal, mesmo mantendo as condições experimentais o mais constantes possível, alguns compostos serão favorecidos relativamente a outros. Outro factor a considerar é a grande diversidade de concentrações existentes em amostras tão complexas como os mostos e, particularmente, como os vinhos.

Outro inconveniente é a grande duração da microextração e da análise cromatográfica o que dificulta a análise de um grande número de amostras, tornando-a numa tarefa relativamente morosa.

3.2.4.1 Teores de monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos

Os compostos terpénicos e norisoprenóides em C_{13} assumem um papel preponderante na caracterização aromática de um vinho. Se por um lado são de origem varietal conferindo-lhe uma certa tipicidade, por outro são responsáveis pelos odores agradáveis e qualitativos justificando serem considerados como as principais substâncias do aroma.

Os valores médios obtidos (tabela 3.3) na determinação dos teores de monoterpenóis e norisoprenóides nas 36 amostras de mostos das castas *Boal* (MB), *Malvazia* (MM), *Sercial* (MS) e *Verdelho* (MV), das vindimas de 1998, 1999 e 2000, estão registados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Concentrações médias* ($\mu\text{g/L}$) dos monoterpenóis e dos norisoprenóides em C_{13} nos mostos das diferentes castas, para as três vindimas efectuadas.

Compostos	MB			MM			MS			MV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
<i>monoterpenóis</i>												
(<i>E, E</i>)-farnesal	nd	nd	nd	6,0	8,3	10,8	9,0	8,1	7,4	24,1	35,8	26,8
linalol	2,7	3,8	4,2	43,1	54,5	34,3	10,2	10,8	8,1	20,7	18,0	23,8
terpine-4-ol	5,2	4,9	5,8	1,8	1,4	1,6	7,3	7,8	7,4	5,2	5,5	5,3
α -terpineol	3,8	3,9	4,9	27,3	24,4	19,6	13,3	13,0	13,4	7,3	8,4	7,5
neral	nd	nd	nd	9,5	9,5	8,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
citronelol	0,3	0,4	0,5	0,2	0,3	0,2	0,7	0,8	0,8	0,2	0,3	0,5
nerol	3,7	2,9	3,4	0,0	1,9	2,6	1,0	0,9	1,3	3,5	4,0	3,8
geraniol	1,9	1,8	3,0	3,9	3,7	4,7	5,2	5,6	6,4	2,7	1,9	2,7
farnesol	52,0	49,9	53,1	37,3	36,1	37,4	18,2	21,2	21,0	15,2	15,6	16,2
<i>norisoprenóides</i>												
β -damascenona	2,1	1,4	2,5	9,0	7,7	9,2	5,6	5,5	5,1	2,2	2,8	1,7
β -ionona	3,5	3,8	3,7	1,9	2,5	2,1	8,1	8,3	8,3	4,3	4,8	4,7

* $n=3$; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Alguns dos compostos da tabela 3.3 ((*E,E*)-farnesal, terpine-4-ol, neral e farnesol), por não dispormos dos padrões, não foram incluídos previamente na validação, mas foram identificados por recurso ao espectro de massa e quantificados assumindo uma resposta equivalente aos terpenóis mais similares. Assim, o (*E,E*)-farnesal e o farnesol foram quantificados assumindo o coeficiente de resposta do nerolidol, o terpine-4-ol o do α -terpineol e o neral o do nerol.

No que se refere aos valores absolutos das concentrações encontradas, estes encontram-se dentro dos teores apresentados na tabela 1.1 (pág. 24) e reportados por outros autores.

A obtenção destes dados permitiu-nos, por um lado, caracterizar os teores destes compostos nos mostos das diferentes castas, e por outro averiguar a existência ou não, de diferenças estatisticamente significativas nos teores de monoterpenóis e norisoprenóides, entre as diferentes castas e entre os diferentes anos de vindima.

O neral apenas foi detectado nos mostos da casta *Malvazia*. Nos mostos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho*, a β -ionona existe em concentrações superiores à β -damascenona contrariamente ao verificado para os mostos da casta *Malvazia*. O (-)-limoneno presente em percentagens apreciáveis nas uvas das diferentes castas (tabela 1. do Anexo A –tabela 1. AA; pág.272), foi detectado nos mostos apenas em quantidades vestigiais (tabela 2. do Anexo A). O óxido de rosa e o neral apenas foram identificados nos mostos da casta *Malvazia*. Os óxidos furânicos de linalol, *cis*- e *trans*-, estão presentes apenas nos mostos das castas *Malvazia* e *Verdelho* (tabela 2. AA; pág.275).

Os mostos da casta *Malvazia* são os que apresentam, em média, os teores mais elevados em monoterpenóis ($129,6 \pm 10,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), contrariamente aos mostos da casta *Sercial* cujos teores não ultrapassam os $66,2 \pm 1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (tabela 3.3). Os mostos das castas *Boal* e *Verdelho* apresentam teores médios de $70,6 \pm 3,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $84,9 \pm 5,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Verificou-se assim, que os teores médios de monoterpenóis dos mostos da casta *Malvazia*, são significativamente mais elevados que os determinados para os mostos das outras castas, considerando os três anos em estudo, 1998, 1999 e 2000 (figura 3.9).

Relativamente aos norisoprenóides, os mostos das castas *Sercial* e *Malvazia* são os mais ricos neste tipo de compostos, com um teor médio, considerando as três vindimas efectuadas, de $13,6 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $10,8 \pm 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Nos

mostos das castas *Boal* e *Verdelho* o teor médio em norisoprenóides determinado foi de $5,7 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de $6,8 \pm 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (figura 3.10).

Na figura 3.9 mostra-se o teor global, para as três vindimas, em monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos das diferentes castas estudadas. Como se pode verificar, o teor em monoterpenóis (Terp) nos mostos da casta *Malvazia* é significativamente diferente ($p < 0,05$) do determinado para os mostos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho*.

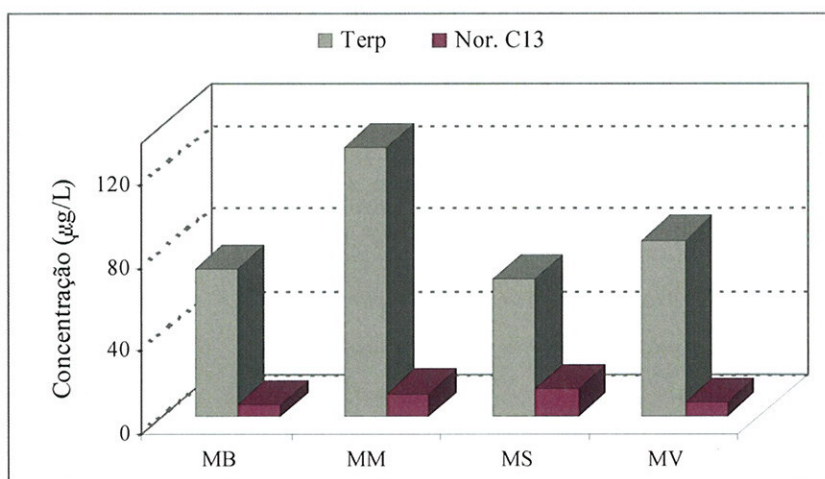


Figura 3.9 – Teores totais dos monoterpenóis (Terp) e norisoprenóides (Nor. C13) determinados para os mostos das diferentes castas estudadas (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

Os teores médios (média \pm desvio padrão) dos monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13} individuais, nos mostos das diferentes castas estudadas, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000, estão representadas na figura 3.10.

Os monoterpenóis maioritários encontrados nos mostos das diferentes castas são, genericamente, o linalol, o α -terpineol e o farnesol, contrariamente ao citronelol que é minoritário em todos os mostos das castas estudadas (figura 3.10).

Verificou-se que nos mostos da casta *Malvazia*, o linalol ($44,0 \pm 9,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), o farnesol ($36,9 \pm 3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o α -terpineol ($23,8 \pm 3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) são os monoterpenóis predominantes, contribuindo com 79,3 % para a totalidade da fracção livre do aroma varietal dos mostos desta casta. No que se refere aos mostos da casta *Verdelho*, o linalol ($20,8 \pm 2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o farnesol ($15,8 \pm 3,7 \mu\text{g.L}^{-1}$) são os monoterpenóis maioritários, perfazendo 57,9 % do total da fracção livre varietal.

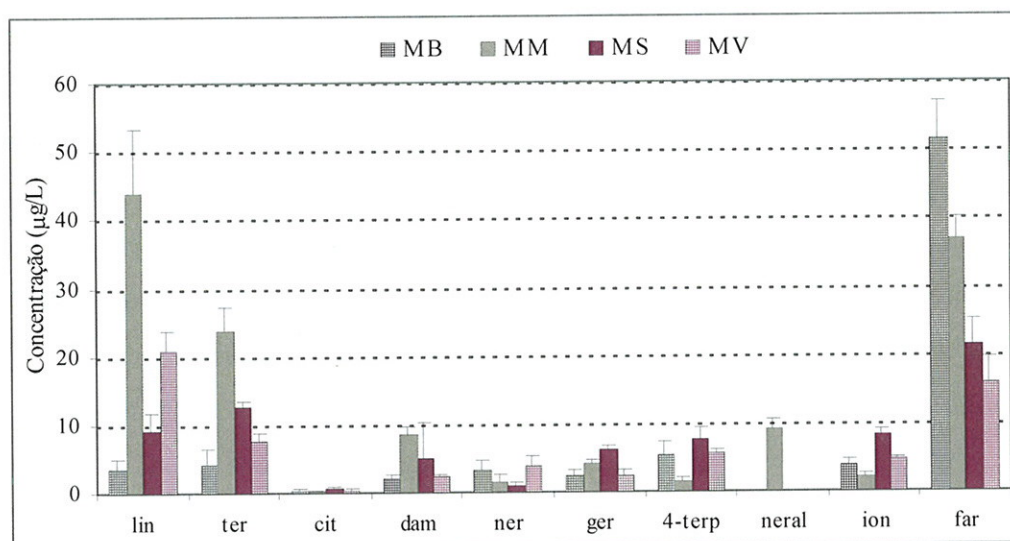


Figura 3.10 – Teores médios ($n=36$) dos monoterpenóides e norisoprenóides individuais determinados para os mostos das diferentes castas, relativos às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

Legenda: 4-terp–terpine-4-ol; neral- neral; far- farnesol.

Nos mostos da casta *Boal* o teor de farnesol ($51,6 \pm 4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) é substancialmente superior ao determinado para os mostos das outras castas, representando 69,2 % do total da fracção livre do aroma varietal. Para os mostos da casta *Sercial*, o farnesol ($20,1 \pm 1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$), o α -terpineol ($13,3 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o linalol ($9,7 \pm 1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$), são os monoterpenóides mais abundantes contribuindo, com 60,0 % para a totalidade da fracção livre varietal dos mostos desta casta.

Os mostos da casta *Malvazia* são os mais ricos em β -damascenona ($8,6 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) contrariamente aos mostos das castas *Boal* ($1,9 \pm 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$) e *Verdelho* ($2,4 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Os mostos da casta *Sercial* apresentam concentrações médias de β -damascenona de $5,1 \pm 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. A β -ionona é mais abundante nos mostos da casta *Sercial* ($8,2 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$), e apresenta os teores mais baixos nos mostos da casta *Malvazia* ($2,2 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$). Nos mostos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho*, os teores da β -ionona são superiores ao da β -damascenona inversamente ao verificado nos mostos da casta *Malvazia*, para os quais foram determinados teores de β -damascenona ($8,6 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) superiores aos da β -ionona ($2,2 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Com limiares de percepção olfativo extremamente baixos (45 ng.L^{-1} para a β -damascenona e $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para a β -ionona), estes compostos contribuem, muito provavelmente, para a definição aromática a “flores” e a “frutos tropicais”, dos mostos das diferentes castas.

Relativamente à influência do ano de colheita, a aplicação da *Anova* revela que não existem, na generalidade, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os teores de monoterpenóis e norisoprenóides encontrados nos mostos das diferentes castas para as três vindimas estudadas. Este facto pode ser visualizado nas figuras 3.11 e 3.12.

A influência do ano de vindima nos teores dos monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13} para os mostos *Malvazia* (MM), está representada na figura 3.11. Os mostos das outras castas estudadas apresentam um perfil similar.

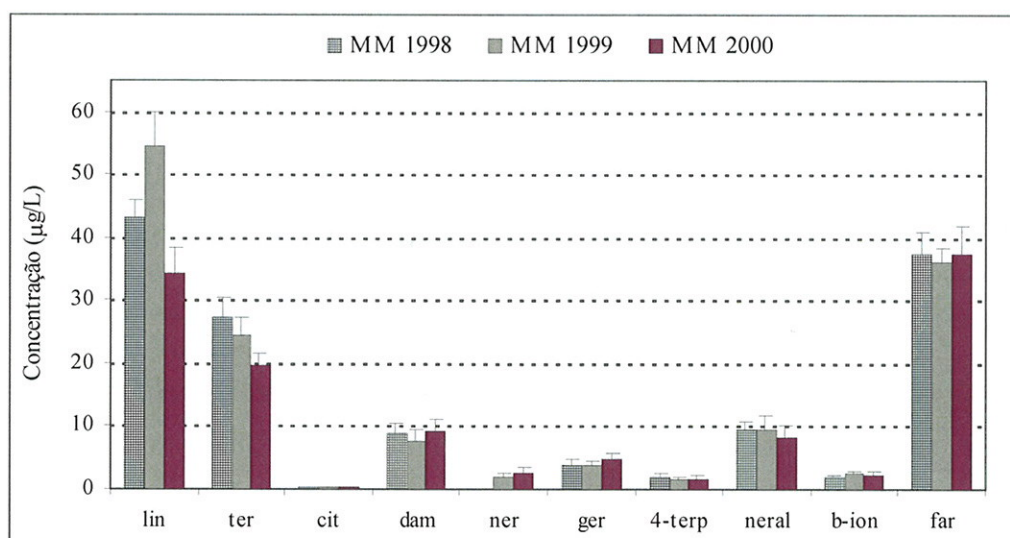


Figura 3.11 – Influência do ano de vindima nos teores dos monoterpenóis e norisoprenóides para os mostos da casta *Malvazia*.

Na figura 3.12 está representado o conteúdo global dos terpenóis (monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13}) livres dos mostos das diferentes castas para os três anos de vindima estudados.

Como se pode verificar, para cada uma das castas estudadas, o teor total de terpenóis livres permanece praticamente constante nos três anos estudados 1998, 1999,

2000, como acontece com a maioria dos monoterpenóis e norisoprenóides individuais (tabela 3.4).

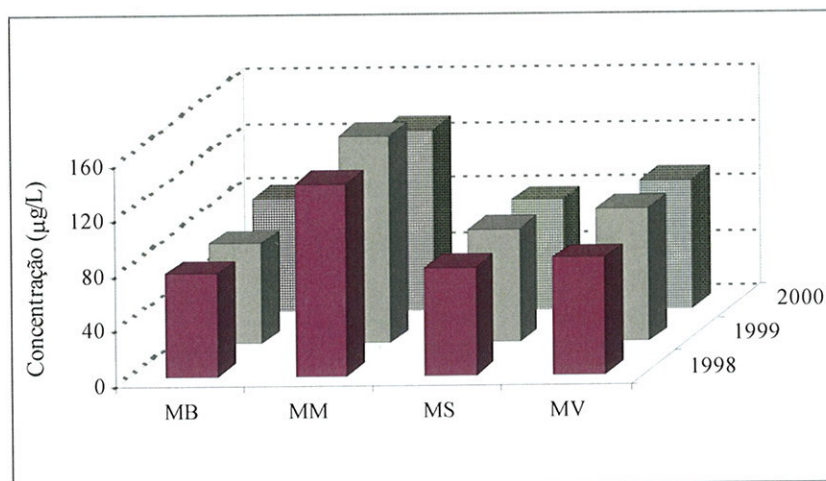


Figura 3.12 – Total de terpenóis livres, por ano de vindima, nos mostos das castas estudadas (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

3.2.4.2 Teores de monoterpenóis e norisoprenóides nos vinhos monovarietais

O nerolidol não foi detectado nos vinhos *Malvazia* e *Verdelho*, no entanto está presente nos vinhos das castas *Boal* e *Sercial*, embora em concentrações muito baixas, $2,9 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos primeiros e $1,7 \pm 0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos segundos.

Os valores médios obtidos na determinação dos teores de monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13} nas 36 amostras de vinhos monovarietais das castas *Boal* (VB), *Malvazia* (VM), *Sercial* (VS) e *Verdelho* (VV), das vindimas de 1998, 1999 e 2000, estão registados na tabela 3.4.

Em termos médios, os compostos de origem varietal mais representativos dos vinhos das quatro castas são o linalol, o α -terpineol e a β -damascenona (tabela 3.4).

Os vinhos da casta *Malvazia* são os que apresentam teores mais elevados em álcoois terpénicos ($37,9 \pm 2,3 \mu\text{g.L}^{-1}$). O α -terpineol ($13,3 \pm 1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$), o linalol ($8,8 \pm 1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o citronelol ($8,3 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$), são os mais abundantes, contribuindo para os vinhos desta casta com 88,8 % para o total do fracção livre varietal.

Para os vinhos da casta *Boal* o teor médio em monoterpenóis determinado foi de $33,9 \pm 3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, com o citronelol ($12,1 \pm 2,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o linalol ($9,3 \pm 1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$), a apresentarem os teores médios mais elevados. Representam 45,8 % do total da fracção livre varietal dos vinhos desta casta.

Tabela 3.4 Concentrações médias* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos monoterpenóis e dos norisoprenóides nos vinhos das diferentes castas, para as três vindimas efectuadas.

Compostos	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
<i>monoterpenóis</i>												
<i>trans</i> -óxido de linalol	0,2	0,2	0,2	1,5	1,7	1,3	nd	nd	nd	0,2	0,2	0,2
<i>cis</i> -óxido de linalol	nd	nd	nd	0,7	0,5	0,6	nd	nd	0,0	0,3	0,3	0,3
linalol	9,9	9,4	8,7	8,7	9,8	8,0	14,6	13,5	13,2	5,5	5,9	5,4
α -terpineol	2,9	3,0	3,6	14,1	13,4	12,5	4,7	5,4	4,0	8,7	8,7	8,7
citronelol	14,5	9,6	12,1	9,2	8,0	7,9	3,9	3,3	2,7	0,9	1,0	0,9
geraniol	2,4	2,3	2,4	4,5	3,7	4,0	6,3	5,6	5,8	1,0	1,1	1,0
nerolidol	3,2	2,5	2,6	nd	nd	nd	1,4	2,2	1,5	nd	nd	nd
farnesol	4,6	3,8	3,5	1,4	1,5	1,2	0,3	0,2	0,2	6,9	7,3	5,8
<i>norisoprenóides</i>												
vitispirano I	2,5	2,8	2,8	0,7	0,8	0,8	0,8	1,2	0,8	0,7	0,8	0,7
vitispirano II	1,8	2,3	2,1	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	0,5	nd	nd	nd
TDN	1,0	1,2	1,5	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,7	0,7	0,6
β -damascenona	6,2	6,8	7,1	12,8	12,3	12,7	5,8	4,3	5,4	6,4	6,5	6,5

* $n=3$; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Nos vinhos da casta *Sercial* o teor médio, em monoterpenóis foi de $29,6 \pm 1,9 \mu\text{g.L}^{-1}$. O linalol ($13,8 \pm 1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o geraniol ($5,9 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), são os compostos varietais mais representativos, perfazendo 53,7 % do total da fracção livre terpénica.

Relativamente aos vinhos da casta *Verdelho*, o α -terpineol ($8,7 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o farnesol ($6,6 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) são os compostos de origem varietal mais abundantes. Representam 49,0 % da totalidade da fracção livre varietal. Das quatro castas em estudo, os vinhos desta casta são os que apresentam os teores médios mais baixos em compostos monoterpénicos ($23,4 \pm 1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Na figura 3.13 está representado o conteúdo global dos compostos varietais (álcoois monoterpénicos e norisoprenóides) dos vinhos das diferentes castas estudadas. Como se pode verificar o teor total de monoterpenóis e norisoprenóides livres nos

vinhos das castas *Boal* e *Malvazia* é superior ao determinado para os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho*.

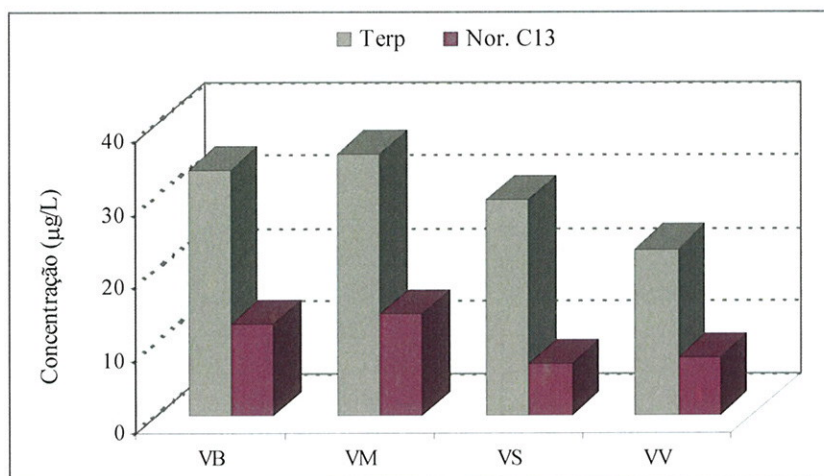


Figura 3.13 – Teor total de monoterpenóis (Terp) e norisoprenóides (Nor. C13) nos vinhos das diferentes castas estudadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho).

Os norisoprenóides em C₁₃ constituem uma fracção ínfima, apenas $0,25 \pm 0,04$ %, do total da fracção volátil livre nos vinhos das castas estudadas. No entanto, devido aos baixos limiares de percepção olfactiva que lhes são atribuídos, podem contribuir para o aroma dos vinhos, mesmo encontrando-se em concentrações extremamente baixas.

Dos quatro norisoprenóides em C₁₃ quantificados, os resultados obtidos indicam que em qualquer dos vinhos das castas estudadas a β -damascenona é o norisoprenóide mais abundante na fracção livre. Os vinhos da casta *Malvazia* ($12,6 \pm 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$) são os mais ricos neste composto, contrariamente aos vinhos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho* que apresentam teores médios muito inferiores aos determinados para os vinhos da casta *Malvazia*, mas muito similares entre si, $6,7 \pm 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$, $5,2 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $6,5 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Com limiares de percepção olfactivo extremamente baixos, 45 ng.L^{-1} , segundo Ribéreau-Gayon *et al.*, (2000), a β -damascenona contribui, muito provavelmente, para a definição aromática a “flores” e a “frutos tropicais”, dos vinhos Madeira das diferentes castas.

Na figura 3.14 estão representados as concentrações médias (média±desvio padrão) dos monoterpénios e norisoprenóides em C₁₃, nos vinhos das castas estudadas referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000.

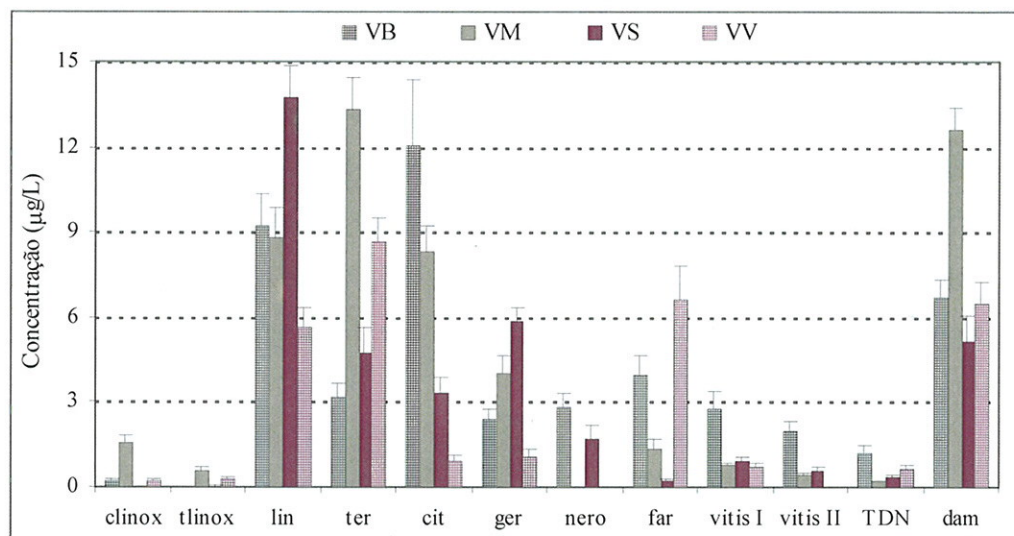


Figura 3.14 – Teores médios (média±desvio padrão) dos compostos varietais presentes nos 36 vinhos das diferentes castas estudadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho).

Legenda: clinox– cis-óxido de linalol; tlinox– trans-óxido de linalol; nero– nerolidol; vitis I– vitispirano I; vitis II– vitispirano II; TDN– 1,2-di-hidro-1,1,6-trimetilnaftaleno.

Além da β -damascenona, já presente nos mostos, verificou-se o aparecimento dos isómeros I e II do vitispirano e do 1,2-di-hidro-1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN), que não foram detectados na fracção livre das uvas e dos mostos, indicando a sua proveniência a partir de precursores norisoprenóides em C₁₃, como os carotenóides, por exemplo.

Os isómeros do vitispirano (I e II) que conferem aos vinhos odores a “cânfora”, apresentam valores muito inferiores ao seu limiar de percepção olfactiva (800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), não contribuindo deste modo para o aroma dos vinhos Madeira novos. Em qualquer dos vinhos das diferentes castas, os teores do vitispirano I são superiores aos do vitispirano II. Os vinhos da casta *Boal* são os que apresentam as concentrações mais elevadas destes isómeros - $2,8\pm 0,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o isómero I e $1,9\pm 0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o isómero II. Nos vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial* os teores

dos isómeros I e II do vitispirano não apresentam diferenças estatisticamente significativas (tabela 3.4). O vitispirano II não foi detectado nos vinhos da casta *Verdelho*.

Outro norisoprenóide odorífero é o TDN. Confere aos vinhos odor a “querosene”, quando presente em quantidades superiores a $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (LPO). As concentrações encontradas para este composto nos vinhos das diferentes castas (tabela 3.4), são muito inferiores a este valor, podendo concluir-se que não participa na complexidade aromática dos vinhos Madeira novos (8 meses).

Os vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* são os que apresentam concentrações mais elevadas de TDN, $1,2 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,7 \pm 0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Não se verificam diferenças significativas nos valores de TDN encontrados para as diferentes vindimas (1998, 1999 e 2000).

A figura 3.15 mostra a influência do ano de vindima nos teores dos monoterpenóis e norisoprenóides em C_{13} para os vinhos da casta *Malvazia* (VM). Os vinhos das outras castas estudadas apresentam um perfil similar.

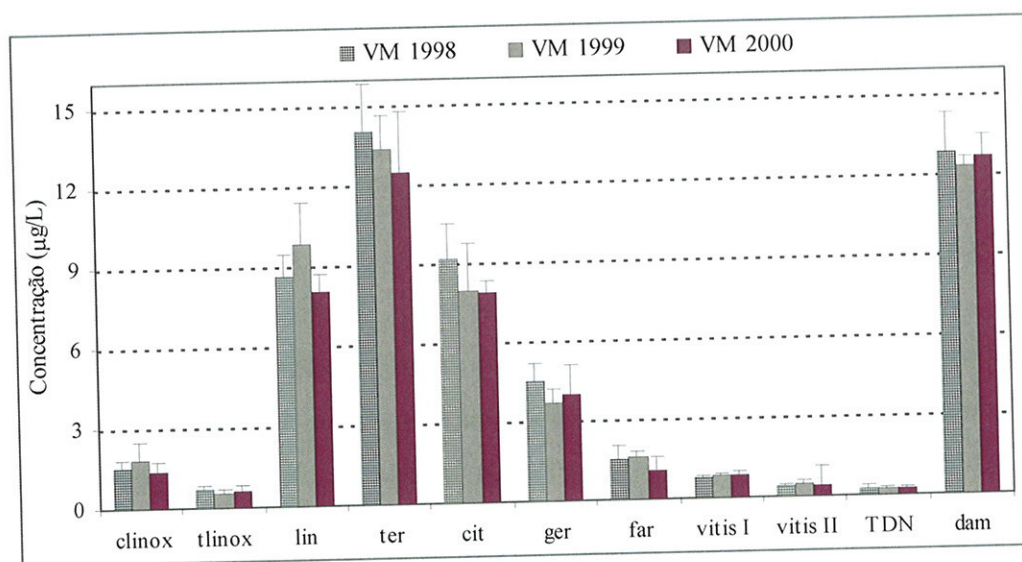


Figura 3.15 – Influência do ano de vindima no teor de monoterpenóis e norisoprenóides, exemplificada para os vinhos da casta *Malvazia*.

Relativamente à influência do ano de colheita, a aplicação da *Anova* revela que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os teores de

monoterpenóis e norisoprenóides encontrados nos vinhos das diferentes castas para as três vindimas estudadas.

O conteúdo global em terpenóis nos vinhos das diferentes castas, por ano de colheita, está representado na figura 3.16.

Como se pode verificar, o total de terpenóis livres permanece, como acontece com a maioria dos terpenóis individuais (figura 3.15), praticamente constante nos três anos estudados.

Em nenhuma das três colheitas se quantificaram teores importantes, organolepticamente falando.

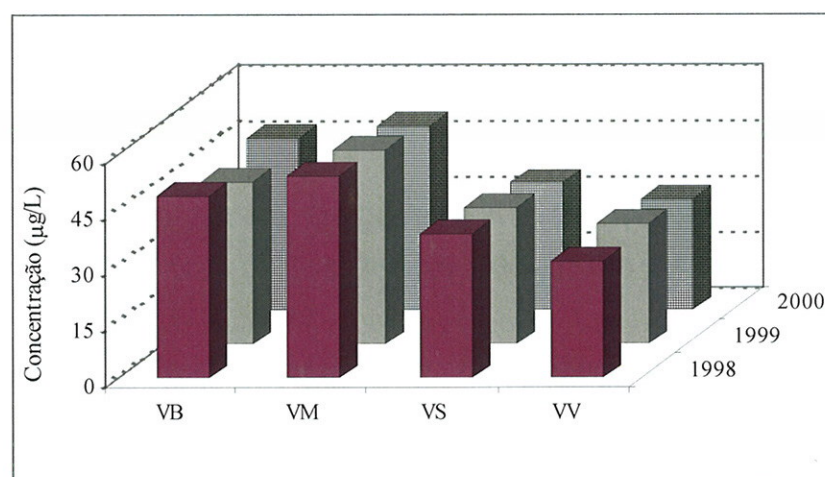


Figura 3.16 – Perfil do total de terpenóis nos vinhos monovarietais em cada uma das castas, nas três vindimas estudadas.

O facto das uvas serem provenientes da mesma região geográfica, sujeitas portanto às mesmas condições climatéricas, a práticas agrícolas similares e cultivadas em solos com as mesmas características, aliado ao facto dos vinhos terem sido produzidos com técnicas semelhantes, podem justificar a variação pouco significativa dos teores dos monoterpenóis e norisoprenóides, determinados para as três vindimas.

As concentrações determinadas para qualquer dos terpenóis estão abaixo do limiar de percepção olfactivo (tabela 1.2, *pág. 27*) não contribuindo, deste modo, para o aroma dos vinhos das castas estudados. Verificou-se, no entanto, que nos vinhos da casta *Boal*, o teor de citronelol ($12,1 \pm 2,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) está próximo do seu limiar de percepção olfactivo que é de $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de acordo com Riberau-Gayon *et al.*, (1991).

Tendo em consideração os baixos valores obtidos para as três vindimas, os monoterpenóis livres parecem não desempenhar um papel importante no aroma varietal dos vinhos obtidos a partir das quatro castas estudadas. Poderia pensar-se na utilização de enzimas glicosidásicas ou na prática da maceração pré-fermentativa, para obter um incremento no conteúdo terpénico dos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, de forma a conferir-lhes o carácter floral típico que se atribui a esta família da compostos.

Embora os resultados obtidos para os terpenóis sejam comparáveis aos obtidos por outros autores para castas referenciadas como neutras, seria importante, para a validação dos resultados, proceder à realização de ensaios de comparação interlaboratorial.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DAS UVAS DAS CASTAS *BOAL*, *MALVAZIA*, *SERCIAL* E *VERDELHO*

A composição média, em percentagem mássica, das diferentes partes constituintes do bago nas castas em estudo está representada na figura 3.17.

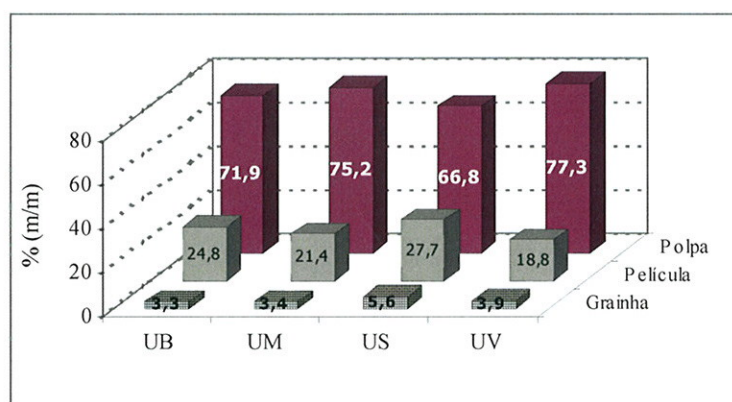


Figura 3.17 – Composição média dos bagos nas diferentes castas estudadas.

Verificou-se que as uvas das castas *Malvazia* e *Verdelho* são as que possuem maior quantidade em polpa, enquanto que as uvas da casta *Sercial* apresentam a percentagem mais elevada de películas e grainhas.

Os resultados foram obtidos considerando o peso médio de 100 bagos, para cada uma das castas estudadas, colhidos na vindima de 2000.

A fracção livre dos extractos das uvas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, obtida e analisada como descrito em 2.6.2.1 (pág. 96), permitiu a identificação de cerca de 6 dezenas de compostos aromáticos, entre os quais vários monoterpénos, 7 álcoois monoterpénicos, 4 compostos em C₆, 6 álcoois superiores, 10 ácidos gordos voláteis, 10 compostos carbonilados, 7 derivados furânicos, entre outros (tabela 3.5).

Na figura 3.18, representa-se um cromatograma de corrente iónica total, dos compostos voláteis da fracção livre de uma amostra de uvas *Boal* da vindima de 2000.

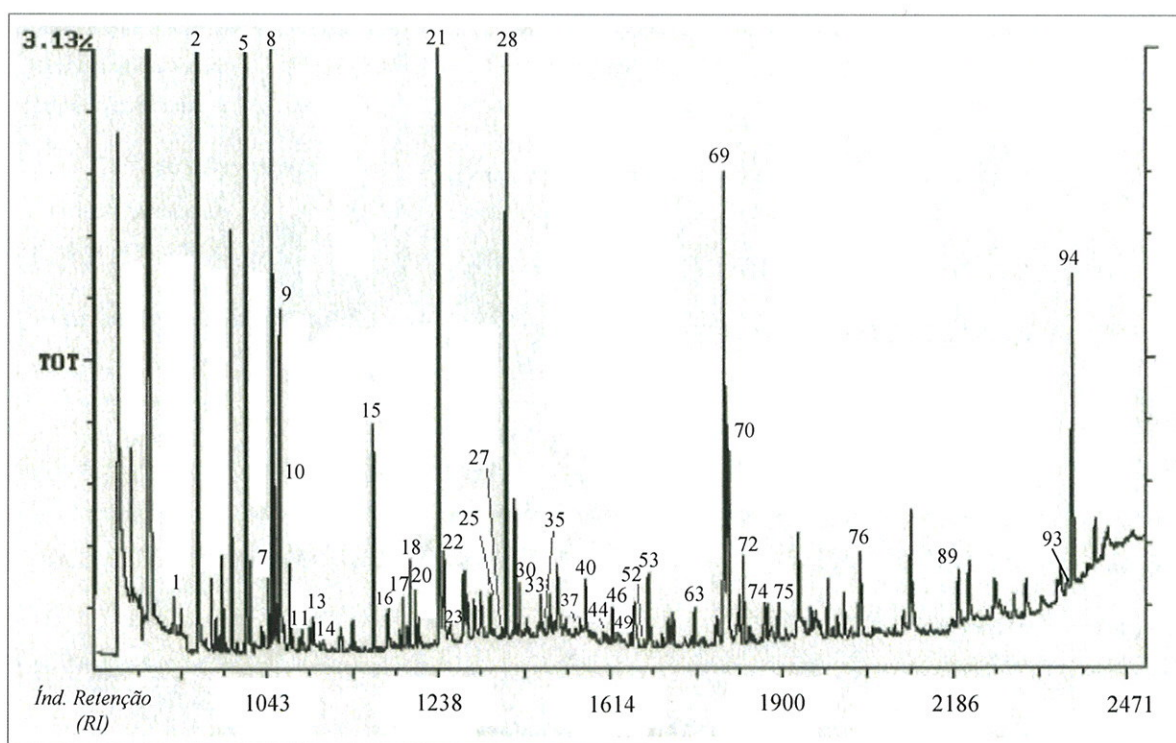


Figura 3.18 – Cromatograma GC-MS dos compostos voláteis da fracção livre de uma amostra de uvas *Boal* da vindima de 2000, resultante da extração por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo com as condições dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se descrita na tabela 3.5.

Os compostos, na sua maioria, foram identificados por comparação dos espectros de massa obtidos com os da base de dados da NIST92 de acordo com os seguintes critérios: percentagem de 80 % para o ajuste (fit) e 75 % para a pureza

(purity), como valores mínimos aceitáveis para a identificação. Sempre que possível os compostos foram identificados através do tempo de retenção e do espectro de massa dos compostos puros e/ou por comparação com espectros de massa publicados.

Na tabela 3.5 descrevem-se os compostos identificados nas uvas das diferentes castas estudadas. Os parâmetros instrumentais do GC-MS, são os constantes do quadros I (pág. 95). As condições de extracção e o método utilizado, estão descritos em 2.6.2.1 (pág. 96) e 2.6.2.2 (pág. 97).

Tabela 3.5 Compostos identificados nas uvas das diferentes castas, extraídos por HS-SPME com fibra de poliacrilato.

Terpenos	71	geraniol	93	ácido dodecanóico		
3	3-careno	89	farnesol	95	ácido tetradecanóico	
4	β -pineno	Norisoprenóides em C₁₃				
5	limoneno	65	β -damascenona	Ésteres etílicos		
6	β -felandreno	75	β -ionona	9	hexanoato de etilo	
7	β -Ocimeno	Álcoois superiores			86	palmitato de etilo
11	p-cimeno	15	hexan-1-ol	Compostos carbonilados		
13	α -terpineno	16	(Z)-hex-3-en-1-ol	2	nonanal	
14	canfeno	17	(Z)-hex-2-en-1-ol	8	(E)- hex-2-enal	
23	copaeno	40	nonan-1-ol	19	(E)- oct-2-enal	
27	valenceno	72	álcool benzílico	24	benzaldeído	
28	linalol	74	2-feniletanol	25	(Z)- non-6-enal	
32	(-)-aristoleno	Ácidos gordos voláteis			51	D(+)-carvona
33	terpine-4-ol	21	ácido acético	54	γ -butirolactona	
34	β -gurjuneno	26	ácido propanóico	55	MPCP ¹	
35	β -ciclocitral	69	ácido hexanóico	60	2-propil-ciclohexan-1-ona	
37	cariofileno	76	ácido (E)- hex-2-enóico	67	HMCP ²	
42	δ -selineno	80	ácido octanóico	Furanos		
44	α -cububeno	83	ácido nonanóico	20	5-metil-2(3H)-furanona	
46	α -terpineol	88	ácido decanóico	22	2,5-dimetilfuran	
52	neral	92	ácido benzóico	30	5-metilfurfural	
53	α -farneseno				41	5-metil-2(5H)-furanona
57	cis-carveol				82	3-furanometanol
61	citronelol				91	ácido 2-furanocarboxílico
63	nerol				94	5-(hidroximetil)furfural
68	trans-carveol					
70	geranilcetona					

¹MPCP: 2-(1-metilpropil)ciclopentan-1-ona; ²HMCP: 2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona

Os valores médios ($n=5$) das áreas relativas (Ac/Api) para cada composto volátil, expressos em função do padrão interno (octan-3-ol), obtidos para as quatro castas estudadas, relativamente à vindima de 2000, estão registados na tabela 1 do Anexo A (tabela 1. AA; pág. 272).

Na figura 3.19 são apresentadas, sob a forma de histograma, as percentagens dos diferentes grupos de compostos aromáticos, relativamente ao total da fracção livre aromática das uvas de cada casta estudada.

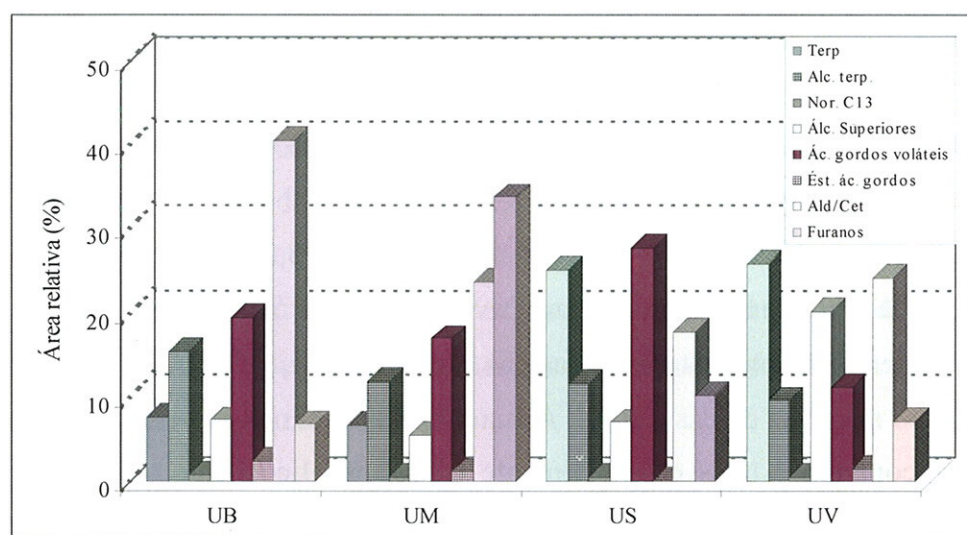


Figura 3.19 - Percentagem de cada grupo de compostos aromáticos da fracção livre das uvas (exceptuando o (-)-limoneno), expressa em termos de área relativa, nas diferentes castas estudadas, relativamente ao total de cada casta (Ter – monoterpenos; Alc. Terp. – álcoois terpénicos; Nor. C13 – norisoprenóides em C₁₃; Ald/Cet – aldeídos /cetonas).

Dos resultados obtidos, constata-se que o (-)-limoneno (identificado com uma probabilidade de 87,9 %) é o composto mais abundante em qualquer das castas, representando, em média, $92,8 \pm 8,2$ % (média \pm desvio padrão) do total da fracção terpénica livre das uvas da casta *Boal*, e $95,5 \pm 7,4$ %, $93,7 \pm 6,3$ % e $94,4 \pm 8,7$ % para as uvas das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, respectivamente.

Perante estes valores relativamente elevados, optou-se por não considerar as áreas do (-)-limoneno no cálculo das percentagens porque sendo tão dispares, tornaria difícil a interpretação gráfica dos resultados. Não foram igualmente considerados alguns dos compostos identificados por apresentarem baixos valores das áreas relativas

(Ac/Api<0,05) e por não se enquadrarem em nenhum dos grupos de compostos aromáticos constituídos.

Os monoterpenos perfazem, em média, $16,3 \pm 8,8$ %, da fracção livre total das castas estudadas, considerando as três vindimas. O α -Ocimeno (Ac/Api= $19,5 \pm 4,5$), o β -pineno (Ac/Api= $25,2 \pm 7,1$), o 3-careno (Ac/Api= $4,3 \pm 1,1$) e o α -farneseno (Ac/Api= $4,2 \pm 0,3$) nas uvas da casta *Verdelho*, o β -pineno (Ac/Api= $20,2 \pm 6,7$) nas uvas da casta *Sercial*, e o α -cubebeno (Ac/Api= $5,3 \pm 1,5$) nas uvas da casta *Boal*, são os monoterpenos que mais contribuem para a percentagem deste grupo de compostos.

Dos álcoois monoterpénicos, o linalol (Ac/Api= $35,7 \pm 6,5$) e o geraniol (Ac/Api= $12,9 \pm 2,8$) nas uvas da casta *Verdelho*, destacam-se dos valores encontrados para as outras castas. O linalol é o álcool terpénico mais abundante nas uvas das quatro castas, contribuindo com 74,1 %, 58,2 %, 57,7 % e 40,2 %, respectivamente, para a totalidade da fracção livre varietal, nas uvas das castas *Sercial*, *Malvazia*, *Verdelho* e *Boal*. O α -terpineol presente nas uvas das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, não foi identificado nas uvas da casta *Boal*. A sua identificação nos mostos desta casta, sugere que se encontra nas uvas essencialmente na forma glicosilada, tendo sido formado, enzimaticamente, durante a etapa pré-fermentativa.

Apenas foram identificados dois norisoprenóides em C₁₃, a β -damascenona e a β -ionona, esta com áreas relativas superiores em qualquer das castas estudadas (Ac/Api= $0,6 \pm 0,24$ nas uvas *Sercial* a $2,3 \pm 0,73$ nas uvas *Boal*). A β -damascenona não foi encontrada nas uvas *Verdelho* e apresenta o valor mais elevado de área relativa, $0,34 \pm 0,012$, nas uvas *Boal*. Estes baixos valores justificam o facto destes compostos se encontrarem nas uvas maioritariamente na forma glicosilada.

Em termos percentuais, as uvas da casta *Verdelho* são as mais ricas em álcoois superiores. Estes contribuem com $20,2 \pm 7,4$ % para a fracção livre aromática desta casta. A contribuição dos álcoois superiores para a fracção livre das outras castas é significativamente mais baixa: $7,2 \pm 2,7$ % nas uvas da casta *Boal*, $5,5 \pm 1,8$ % nas uvas da casta *Malvazia* e $7,0 \pm 1,4$ % nas uvas da casta *Sercial*. São de referenciar as elevadas áreas relativas do hexan-1-ol (Ac/Api= $13,5 \pm 3,1$) nas uvas *Boal* e do álcool benzílico (Ac/Api= $33,2 \pm 8,4$) nas uvas *Verdelho*. Estes dois compostos representam $71,2 \pm 7,7$ % da totalidade dos álcoois superiores nas uvas da casta *Verdelho*, $64,1 \pm 4,9$ % nas uvas

da casta *Boal*, $62,6 \pm 5,4$ % nas uvas da casta *Malvazia* e $53,2 \pm 7,2$ % nas uvas da casta *Sercial*. Para qualquer das castas estudadas as áreas relativas do álcool benzílico são superiores às do 2-feniletanol.

Dos ácidos gordos voláteis, que contribuem com $18,8 \pm 6,9$ % para a totalidade da fracção aromática livre das uvas das diferentes castas, os ácidos acético e hexanóico são os que maior peso têm nesta percentagem. Nas uvas *Sercial*, estes dois ácidos gordos, contribuem conjuntamente com $90,5 \pm 4,8$ % para a totalidade da fracção livre deste grupo de compostos. Para as uvas das outras castas, a contribuição dos ácidos acético e hexanóico, é de $82,2 \pm 8,1$ %, $81,0 \pm 6,3$ % e $79,9 \pm 9,6$ % para as uvas das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*, respectivamente.

No que se refere à contribuição deste grupo de compostos para a totalidade da fracção livre aromática das uvas de cada casta, as uvas das castas *Boal* e *Sercial* são as que apresentam valores relativos percentuais mais elevados, $19,4 \pm 6,1$ % e $27,8 \pm 8,3$ %, respectivamente. Para as uvas da casta *Malvazia* a contribuição é de $17,0 \pm 5,8$ % enquanto que $11,1 \pm 2,9$ % é a contribuição dos ácidos gordos voláteis para a fracção livre aromática das uvas da casta *Verdelho*.

São igualmente de realçar as elevadas áreas relativas dos aldeídos *hexanal* e (*E*)-*hex-2-enal*. Estes compostos têm a sua génese durante a manipulação das uvas por acção de enzimas endógenas na presença de oxigénio, a partir dos lípidos precursores (ácidos linoleico e linolénico). Os baixos limiares de percepção olfactiva que lhes são atribuídos, $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $17 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Fezzalari, 1978) respectivamente, pressupõem que podem contribuir com notas herbáceas para o perfil aromático das diferentes castas de uvas produtoras de vinho Madeira.

As uvas da casta *Boal* são as mais ricas em hexanal e (*E*)-*hex-2-enal*, com áreas relativas de $78,7 \pm 11,4$ e de $74,3 \pm 9,3$, respectivamente. Inversamente, das quatro castas estudadas, as uvas da casta *Sercial* são as que apresentam as áreas relativas mais baixas para o hexanal ($\text{Ac}/\text{Api}=10,5 \pm 3,3$) e para o (*E*)-*hex-2-enal* ($\text{Ac}/\text{Api}=9,4 \pm 2,4$). As uvas das castas *Boal* e *Malvazia* apresentam áreas relativas destes dois compostos que não diferem significativamente (tabela 1. AA; pág. 272). Estes dois aldeídos contribuem, conjuntamente, com 93,8 % para a fracção livre dos compostos carbonilados nas uvas da casta *Boal*. Relativamente às uvas das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, representam 85,3 % e 67,7 % e 91,2 %, respectivamente.

Os compostos furânicos constituem um dos grupos mais abundantes da fracção livre aromática das uvas das diferentes castas. Representam, em média, considerando as três vindimas efectuadas, 14,5 % do total da fracção livre das uvas. Das quatro castas estudadas, as uvas da casta *Malvazia* são as que apresentam a percentagem mais elevada em compostos furânicos, $33,7 \pm 9,2$ %. Este valor é devido, essencialmente, à contribuição significativa do 5-(hidroximetil)furfural (HMF) ($Ac/A_{pi}=70 \pm 20,1$) e da 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4H-pirano-4-ona (DDMP) ($Ac/A_{pi}=16,4 \pm 2,3$) nas uvas *Malvazia*, comparativamente às razões encontradas para as outras castas (13,0 a 18,4 para o HMF e 0,4 a 3,3 para a DDMP).

Para as uvas da casta *Boal*, a totalidade da fracção livre aromática (somatório das razões das áreas – Ac/A_{pi} , para todos os compostos), considerando as três vindimas, perfaz em média, uma razão de $401,9 \pm 37,1$. Estes valores são bastante mais elevados do que os obtidos para as uvas das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, $307,5 \pm 25,5$; $164,5 \pm 41,2$ e $272,1 \pm 22,6$, respectivamente.

Estes valores de áreas relativas são significativamente mais baixos quando comparados com os obtidos para os mostos e para os vinhos.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DOS MOSTOS DAS CASTAS *BOAL*, *MALVAZIA*, *SERCIAL* E *VERDELHO*

Os compostos voláteis dos mostos das diferentes castas produtoras de vinho Madeira, foram extraídos por HS-SPME utilizando uma fibra de poliacrilato, PA-85 μm , de acordo com as condições do quadro I (pág. 95).

Na fracção livre dos mostos das diferentes castas estudadas, foram identificados, aproximadamente, 8 dezenas de compostos voláteis que incluem 18 compostos monoterpénicos, 2 norisoprenóides em C_{13} , 14 álcoois superiores, 3 acetatos de álcoois superiores, 12 ácidos gordos voláteis, 9 ésteres etílicos de ácidos gordos, 6 fenóis voláteis, 3 compostos carbonilados, entre outros. Foram identificados vários compostos cuja presença não foi detectada nas uvas.

As condições de extracção e os parâmetros instrumentais do GC-MS, são os referidos nos quadros I (pág. 95) e II (pág. 107), respectivamente.

Na figura 3.20, representa-se um cromatograma de corrente iónica total, dos compostos voláteis da fracção livre de uma mosto *Verdelho* da vindima de 2000.

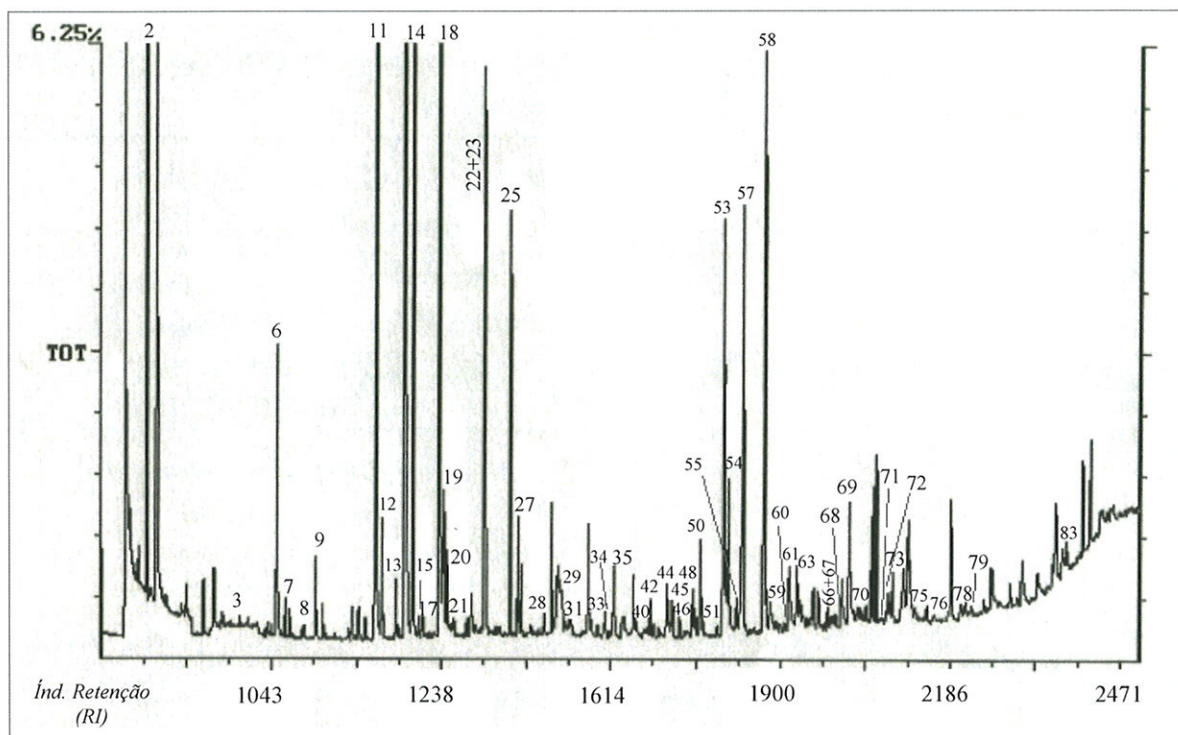


Figura 3.20 – Cromatograma GC-MS de uma amostra de mosto *Verdelho* da vindima de 2000, resultante da extracção por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo com as condições dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se na tabela 3.6.

Os compostos, na sua maioria, foram identificados por comparação dos espectros de massa obtidos com os da base de dados da NIST92 de acordo com os seguintes critérios: percentagem de 80 % para o ajuste (fit) e 75 % para a pureza (purity), como valores mínimos aceitáveis para a identificação. Alguns foram identificados através do tempo de retenção e do espectro de massa dos compostos puros e/ou por comparação com espectros de massa publicados.

Na tabela 2 do anexo A (tabela 2. AA; pág. 275) estão registados os resultados obtidos para os mostos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000. São apresentados os valores médios ($n=3$) das áreas relativas (Ac/A_{pi}) de cada composto e o intervalo de confiança (95 %) para os compostos identificados.

Na tabela 3.6 descrevem-se os compostos identificados nos mostos das diferentes castas estudadas, com um ajuste mínimo (fit) de 80 % e uma pureza (purity) de 75 %.

Tabela 3.6 Compostos identificados nos mostos das diferentes castas estudadas após extração por HS-SPME de acordo com as condições dos quadros I e II.

Terpenos		14	(E)-hex-2-en-1-ol	16	octanoato de etilo
5	(-)-limoneno	15	(Z)-hex-2-en-1-ol	30	decanoato de etilo
10	óxido de rosa	19	oct-3-en-1-ol	31	benzoato de etilo
17	trans-óxido de linalol	20	heptan-1-ol	34	cis-9-decenoato de etilo
21	cis-óxido de linalol	38	3-metilpropan-1-ol	46	benzoacetato de etilo
22	(E,E)-farnesal	57	álcool benzílico	52	dodecanoato de etilo
25	linalol	58	2-feniletanol	71	cinamato de etilo
26	des. 1 (C ₁₅ H ₂₄)	72	2-fenoxietanol		
28	terpine-4-ol				
35	α -terpineol	Acetatos de álcoois			Compostos carbonilados
36	des. 2 (C ₁₅ H ₂₄)	4	acetato de 3-metilbutilo	1	acetaldeído
37	δ -selineno	9	acetato de hexilo	23	benzaldeído
40	neral	50	acetato de 2-feniletilo	29	benzoacetaldeído
43	δ -cadineno				
45	citronelol	Ácidos gordos voláteis			Fenóis voláteis
48	nerol	18	ácido acético	44	salicilato de metilo
54	geraniol	25	ácido propanóico	66	metileugenol
75	(+)-aromadendreno	33	ácido 3-metilbutanóico	68	4-etilguaiaacol
79	farnesol	53	ácido hexanóico	70	4-etilfenol
		61	ácido 2-etil-hexanóico	74	eugenol
		62	ácido (E)-hex-3-enóico	80	isoeugenol
		63	ácido (E)-hex-2-enóico		
		69	ácido octanóico	Furanos	
		73	ácido nonanóico	67	γ -dodecalactona
		78	ácido decanóico	84	5-hidroximetilfurfural
		82	ácido benzóico		
		83	ácido dodecanóico		
		Ésteres etílicos de ácidos			Diversos
		2	acetato de etilo	32	non-1-eno
		7	hexanoato de etilo	39	non-3-ino
				60	benzotiazol
				65	1,3-dimetilnaftaleno
				76	1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno
Norisoprenóides em C₁₃					
51	β -damascenona				
59	β -ionona				
Álcoois superiores					
3	butan-1-ol				
6	2-metilbutan-1-ol				
8	pentan-1-ol				
11	hexan-1-ol				
12	(E)-hex-3-en-1-ol				
13	(Z)-hex-3-en-1-ol				

As percentagens dos diferentes grupos de compostos aromáticos determinadas para os mostos das castas estudadas, exceptuando o hexan-1-ol, distribuem-se como assinalado na tabela 3.7. Para estes valores percentuais não se consideraram as áreas

relativas do hexan-1-ol, que por serem significativamente mais elevadas que as dos outros compostos, dificultariam a interpretação gráfica. Verificou-se que o hexan-1-ol contribui com $41,6 \pm 0,7$ % para a totalidade da fracção livre volátil dos mostos da casta *Boal*. Para os mostos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, a contribuição do hexan-1-ol é de $40,3 \pm 2,3$ %, $16,6 \pm 0,4$ % e $39,8 \pm 1,6$ %, respectivamente.

Tabela 3.7 Percentagens médias* expressas em termos de áreas relativas, de cada grupo de compostos aromáticos (exceptuando o hexan-1-ol) da fracção livre dos mostos das diferentes castas estudadas, para as vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

Grupos de Compostos	MB (%)			MM (%)			MS (%)			MV (%)		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
Terpenos	7,1	6,3	7,7	10,4	10,9	10,1	14,5	12,6	16,2	8,5	8,4	9,1
Norisoprenóides em C ₁₃	0,5	0,5	0,6	1,4	1,2	1,5	1,4	1,5	1,2	1,3	1,3	1,3
Álcoois superiores	57,0	56,7	55,7	51,3	51,5	50,8	49,0	50,5	49,2	61,5	59,6	57,4
Acetatos de álcoois	2,6	1,9	1,6	4,1	4,1	4,4	0,7	0,7	0,7	2,4	2,7	2,3
Ácidos gordos voláteis	18,6	17,5	22,6	14,0	12,0	14,0	15,2	14,5	16,6	13,1	14,3	16,0
Ésteres etílicos de ácidos gordos	6,1	6,9	4,1	15,9	20,9	22,3	10,6	10,9	8,9	12,4	12,5	12,9
Aldeídos/Cetonas	4,2	4,9	3,5	1,9	2,3	1,5	4,5	4,6	3,5	0,3	0,5	0,4
Fenóis voláteis	3,4	4,8	3,0	0,7	0,9	0,5	3,0	3,5	2,9	0,2	0,2	0,2
Furanos	0,6	1,2	0,4	0,2	0,4	0,3	1,1	1,3	0,8	0,3	0,5	0,3

*n=3

Para os mostos das castas *Boal* e *Malvazia*, a fracção livre volátil, considerando as três vindimas, perfaz em média, um total (somatório das razões das áreas – Ac/Api, de todos os compostos) de $1141,5 \pm 47,4$ e $1119,7 \pm 29,1$, respectivamente. Estes valores são bastante mais elevados do que os obtidos para os mostos da casta *Sercial*, $364,5 \pm 27,5$, mas similares aos determinados para os mostos da casta *Verdelho*, $1103,3 \pm 23,4$ (tabela 2. AA; pág. 275). Para estes totais contribuem, em grande extensão, as áreas relativas do hexan-1-ol.

O gráfico da figura 3.21 mostra a variação do total da fracção livre aromática nos mostos das diferentes castas estudadas, podendo corroborar a grande diferença existente entre a totalidade da fracção livre dos mostos da casta *Sercial* e os mostos das restantes castas. Esta diferença, deve-se fundamentalmente, aos baixos valores das áreas relativas dos álcoois superiores obtidos para os vinhos desta casta comparativamente aos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*.

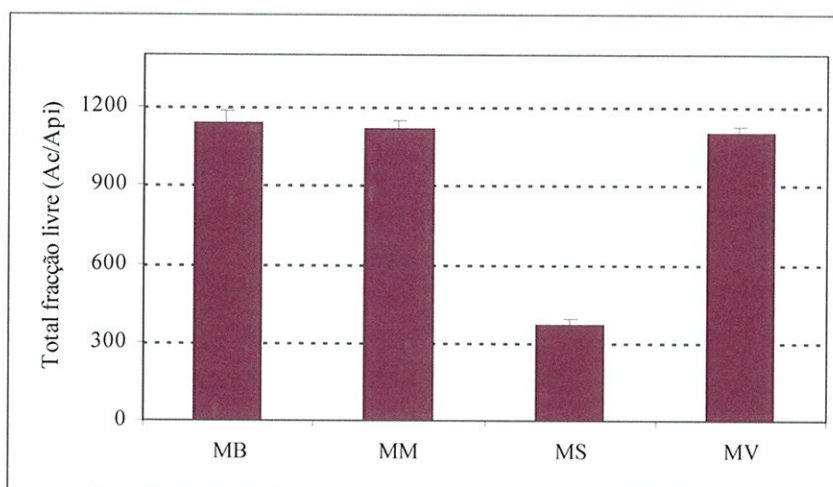


Figura 3.21 – Total da fracção livre aromática dos mostos das diferentes castas estudadas.

Na figura 3.22 representam-se, sob a forma de histograma, as percentagens médias de cada grupo de compostos voláteis relativamente ao total da fracção livre aromática de cada casta, determinada para os mostos da vindima de 1999.

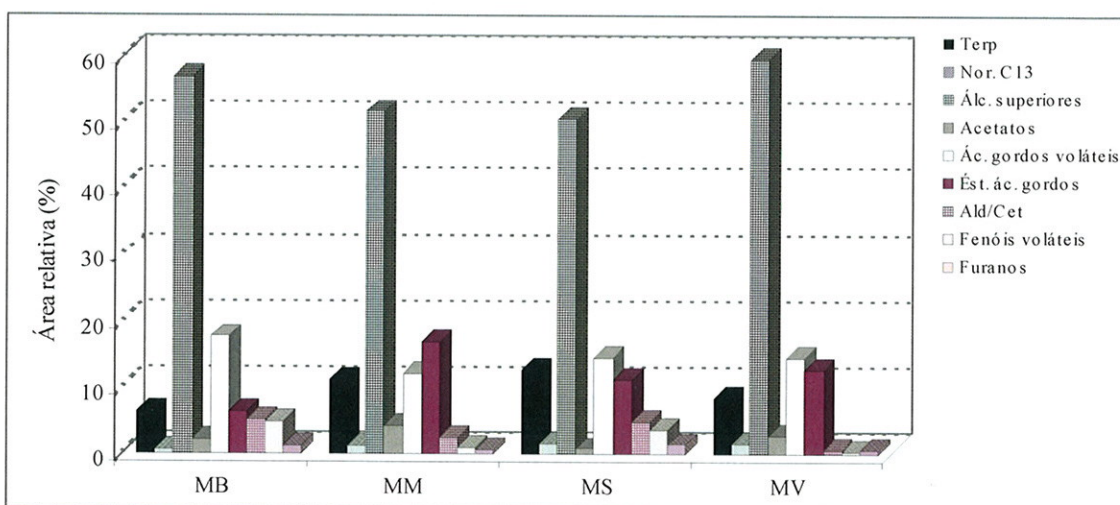


Figura 3.22 - Percentagens (exceptuando o hexan-1-ol) dos diferentes grupos de compostos da fracção livre do aroma dos mostos das diferentes castas estudadas, referentes à vindima de 1999, expressas em termos de áreas relativas.

Os álcoois superiores constituem o grupo mais abundante representando, em média, $54,2 \pm 4,6$ %, do total da fracção livre volátil para as três vindimas estudadas.

Nos mostos da casta *Boal* os álcoois superiores representam $56,4 \pm 0,7$ % da totalidade da fracção livre volátil. Para os mostos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, a contribuição dos álcoois superiores para a fracção volátil livre total é de $51,2 \pm 0,3$ %, $49,6 \pm 0,6$ % e $59,5 \pm 1,7$ %, respectivamente.

Este grupo de compostos voláteis é constituído, principalmente, por *n*-álcoois de cadeia aberta em C_6 , com realce para o hexan-1-ol, e compostos aromáticos como o álcool benzílico e 2-feniletanol. Estes três álcoois contribuem, conjuntamente, para a fracção volátil livre dos álcoois superiores com $77,1 \pm 0,3$ %, $66,9 \pm 2,4$ %, $55,6 \pm 1,0$ % e $65,3 \pm 2,3$ %, respectivamente, para os mostos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*.

A figura 3.25 representa um extracto de um cromatograma SIM ($m/z=60+73+87$) de alguns ácidos gordos voláteis, de uma amostra de mosto da casta *Boal* da vindima de 2000.

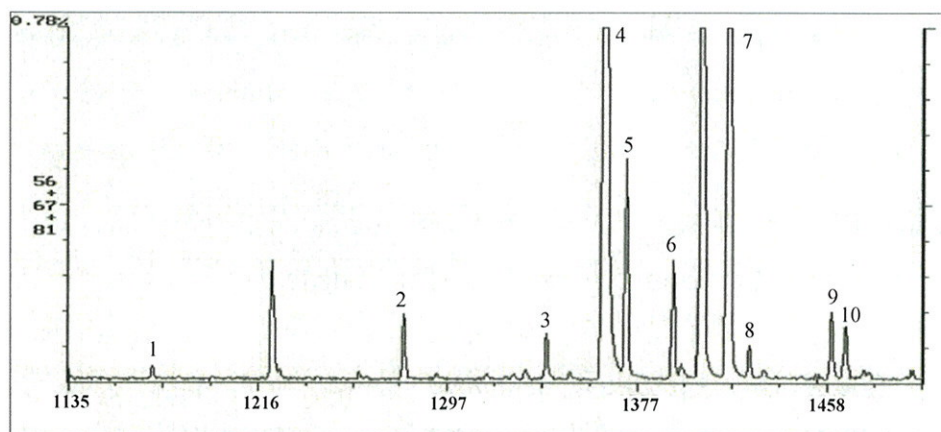


Figura 3.23 – Cromatograma SIM ($m/z=56+67+81$) de alguns álcoois superiores de uma amostra de mosto *Boal* da vindima de 2000.

Legenda: 1- butan-1-ol; 2- acetato de hexilo; 3- 4-metilpentan-2-ol; 4- hexan-1-ol; 5- (*E*)-hex-3-en-1-ol; 6- (*Z*)-hex-3-en-1-ol; 7- (*E*)-hex-2-en-1-ol; 8- (*Z*)-hex-2-en-1-ol; 9- oct-3-en-1-ol; 10- nonan-1-ol.

Dada a importância destes compostos tentou-se quantificar alguns dos compostos deste grupo nos mostos e nos vinhos, por recurso à construção de curvas de calibração após extracção por HS-SPME, de diferentes soluções padrão. O padrão interno utilizado foi o octan-3-ol.

Na tabela 3.8, estão registadas as concentrações médias relativas dos álcoois superiores, para os mostos das quatro castas, nas três vindimas estudadas. Para a quantificação dos isómeros do hex-3-en-1-ol e do hex-2-en-1-ol, utilizou-se o coeficiente de resposta do hexan-1-ol.

Tabela 3.8 Concentrações médias* ($\mu\text{g/L}$) dos álcoois superiores obtidas para os mostos das diferentes castas, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

Álcoois superiores	MB			MM			MS			MV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
2-metilbutan-1-ol	232,0	220,5	198,8	102,8	112,4	91,2	68,6	67,1	56,6	20,2	23,7	21,9
hexan-1-ol	688,1	695,2	642,4	629,5	621,4	672,7	625,0	605,5	632,0	79,6	94,9	88,0
(E)-hex-3-en-1-ol ¹	31,3	27,3	25,5	7,7	7,7	8,2	24,2	25,3	20,7	2,5	3,1	2,7
(Z)-hex-3-en-1-ol ¹	23,3	29,6	27,4	191,4	211,8	190,8	19,5	20,8	21,3	9,4	11,7	10,6
(E)-hex-2-en-1-ol ¹	90,8	93,3	85,8	65,8	72,2	64,5	344,7	337,4	284,7	72,9	87,6	81,1
(Z)-hex-2-en-1-ol ¹	9,4	9,4	8,6	2,5	2,5	1,6	4,2	5,6	4,9	1,0	1,4	1,4
álcool benzílico	104,4	96,6	89,4	11,7	12,4	9,4	53,8	53,2	44,4	21,9	26,2	24,5
2-feniletanol	1191,3	1046,3	1057,0	645,0	707,1	685,0	704,0	682,2	696,5	342,8	409,6	380,4

* $n=3$; 1 : factor de resposta do hexan-1-ol

Em termos médios, os álcoois maioritários são o 2-feniletanol e o hexan-1-ol que, conjuntamente, perfazem $51,8 \pm 0,2$ % da totalidade da fracção livre aromática dos mostos da casta *Boal*. As contribuições destes dois álcoois superiores para a fracção livre total dos mostos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* é de $46,8 \pm 2,4$ %, $27,9 \pm 0,6$ % e $46,3 \pm 1,8$ %, respectivamente.

Nos mostos das castas *Boal* e *Verdelho*, os teores destes dois álcoois superiores apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), sendo no entanto muito similares nos mostos das castas *Malvazia* e *Sercial* (figura 3.24).

Relativamente ao hexan-1-ol, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os teores deste composto nos mostos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Sercial*. No entanto, o teor de hexan-1-ol nos mostos da casta *Verdelho* é substancialmente inferior ao determinado nos mostos das outras castas (figura 3.24).

De acordo com a figura 3.24, em qualquer dos mostos das castas estudadas, a concentração do 2-feniletanol é superior à do hexan-1-ol.

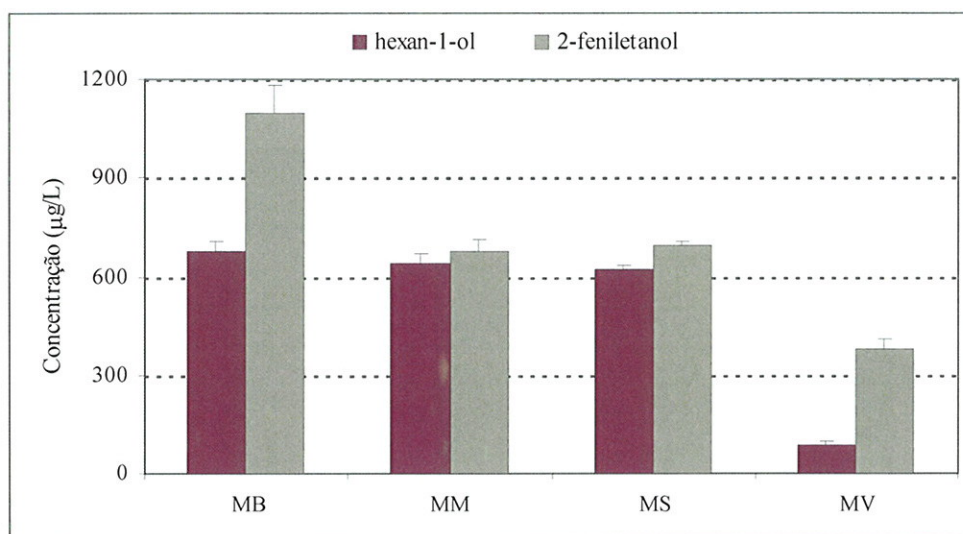


Figura 3.24 – Teores médios (média±desvio padrão) do hexan-1-ol e do 2-feniletanol, nos mostos das diferentes castas estudadas.

Os mostos da casta *Sercial* são os mais ricos em álcoois alifáticos totalizando, em média, para as três vindimas, $1056,1 \pm 33,3 \mu\text{g.L}^{-1}$, inversamente aos mostos da casta *Verdelho* que apresentam os teores mais baixos, $204,5 \pm 18,4 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os mostos das castas *Boal* e *Malvazia* totalizam, respectivamente, $1046,1 \pm 49,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1018,8 \pm 16,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (tabela 3.8). Estes valores, da ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$, são bastante inferiores quando comparados com os obtidos para os vinhos monovarietais correspondentes.

São de realçar os valores do 2-metilbutan-1-ol, do álcool benzílico e do 2-feniletanol, nos mostos da casta *Boal*, significativamente mais elevados que os encontrados para os mostos das outras castas estudadas.

De salientar ainda os elevados valores determinados para o isómero (*Z*) do hex-3-en-1-ol nos mostos da casta *Malvazia* e para o isómero (*E*) do hex-2-en-1-ol nos mostos da casta *Sercial*, comparativamente aos mostos das outras castas. Estes compostos conferem odores não muito agradáveis a “erva” e a “vegetais verdes” (Baumes *et al.*, 1986; Cordonnier, 1989). A sua origem está relacionada principalmente com a actividade da lipoxigenase das uvas (Cordonnier, 1989).

O segundo grupo mais abundante nos mostos das diferentes castas estudadas, são os ácidos gordos voláteis. Perfazem, em média, $15,7 \pm 2,9 \%$ do total da fracção livre aromática.

A figura 3.25 representa um extracto de um cromatograma SIM ($m/z=60+73+87$) de alguns ácidos gordos voláteis, de uma amostra de mosto da casta *Boal* da vindima de 2000.

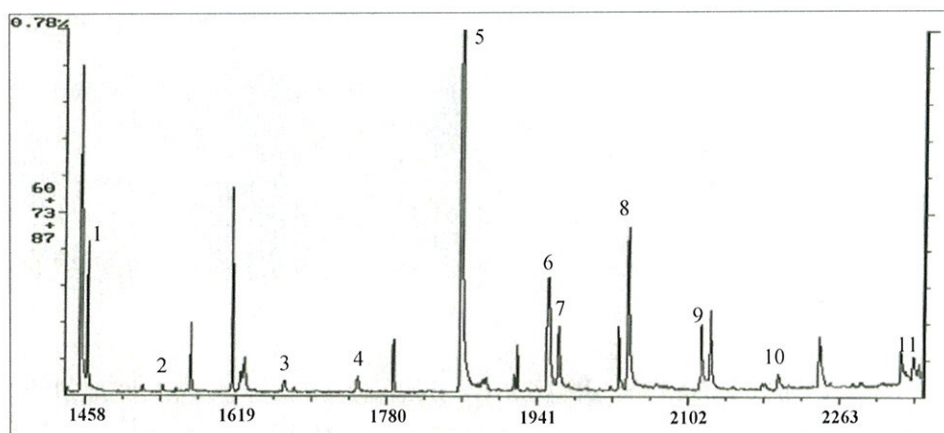


Figura 3.25 – Cromatograma SIM ($m/z=60+73+87$) dos ácidos gordos voláteis de uma amostra de mosto da casta *Boal* da vindima de 2000.

Legenda: 1- acético; 2- propanóico; 3- 3-metilbutanóico; 4- butanóico; 5- hexanóico; 6- 2-etil-hexanóico; 7- (E)- hex-2-enóico; 8- octanóico; 9- nonanóico; 10- decanóico; 11- dodecanóico.

Para os mostos da casta *Boal*, este grupo de compostos contribui com $19,6\pm 2,7$ % para a fracção livre total desta casta. Para os mostos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, os ácidos gordos voláteis representam, respectivamente, $13,3\pm 0,9$ %, $15,4\pm 0,9$ % e $14,5\pm 1,2$ % da totalidade da fracção livre aromática.

Os ácidos acético, hexanóico e octanóico são os compostos mais representativos deste grupo.

Para os mostos da casta *Boal*, estes três ácidos contribuem conjuntamente com $74,9\pm 1,5$ % para a fracção livre total dos ácidos gordos voláteis. Para os mostos da casta *Malvazia* a contribuição é de $78,8\pm 2,3$ %, para os mostos da casta *Sercial* de $82,4\pm 1,9$ %, e para os mostos da casta *Verdelho* a contribuição dos ácidos acético, hexanóico e octanóico, é de $64,8\pm 1,1$ %.

Na tabela 3.9, estão registados os valores médios ($n=3$) das áreas relativas determinados para os ácidos gordos voláteis, nas diferentes castas estudadas.

Tabela 3.9 Valores médios* relativos (Ac/Api), obtidos para os ácidos gordos voláteis nos mostos das diferentes castas estudadas, referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (MB – Mosto Boal; MM – Mosto Malvazia; MS – Mosto Sercial; MV – Mosto Verdelho).

Ácidos gordos voláteis	MB			MM			MS			MV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
ácido acético	22,5	20,6	24,4	32,7	31,2	34,6	44,0	48,4	50,4	12,7	16,4	14,8
ácido propanóico	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
ácido 3-metilbutanóico	2,9	2,3	2,3	3,8	3,6	3,4	0,7	1,4	0,8	0,2	0,4	0,3
ácido 2-etil-hexanóico	5,3	5,0	5,7	1,3	2,3	1,4	3,5	3,8	3,3	0,6	0,7	0,6
ácido 3-etil-hexenóico	nd	nd	nd	1,7	2,6	1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ácido (E)- hex-2-enóico	5,2	6,7	7,7	3,8	4,3	3,4	3,7	4,7	3,6	2,7	3,6	3,3
ácido hexanóico	44,6	41,5	50,0	21,9	19,4	23,3	23,7	24,8	27,2	7,5	7,4	8,4
ácido octanóico	31,3	22,9	34,5	18,4	14,8	13,7	5,6	6,5	7,5	7,7	6,3	9,3
ácido nonanóico	12,6	12,7	14,2	5,2	4,5	5,2	3,2	4,5	3,9	8,3	8,8	9,7
ácido decanóico	3,8	3,2	3,3	0,9	1,3	0,8	0,7	1,4	1,1	1,5	1,8	1,3
ácido benzóico	0,8	0,7	0,9	0,8	1,2	1,2	1,5	2,3	1,7	0,9	0,8	0,8
ácido dodecanóico	0,5	0,4	0,6	0,3	0,2	0,2	1,4	1,1	1,4	0,6	0,8	0,5

*n=3; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Os valores médios das áreas relativas do ácido hexanóico, expressas em função do octan-3-ol, nos mostos da casta *Boal*, $45,4 \pm 4,3$, são significativamente mais elevados do que os encontrados para os mostos das castas *Malvazia* ($21,5 \pm 1,9$), *Sercial* ($25,2 \pm 1,8$) e *Verdelho* ($7,8 \pm 0,6$). Nos mostos das castas *Sercial* e *Verdelho*, as áreas médias relativas do ácido octanóico são significativamente mais baixas ($6,5 \pm 0,9$ para os mostos *Sercial* e $7,7 \pm 1,5$ para os mostos *Verdelho*) do que as determinadas para os mostos da casta *Malvazia*, $15,6 \pm 2,2$. Os mostos da casta *Boal* são os mais ricos em ácido octanóico, por apresentarem valores médios de áreas relativas muito superiores, $29,6 \pm 6,0$, aos determinados para os mostos das outras castas (tabela 3.9).

Em termos percentuais, e considerando as três vindimas estudadas, verificou-se um ligeiro decréscimo deste grupo de compostos, da vindima de 1998 para a vindima de 1999 (1,5 %) e um pequeno aumento da vindima de 1999 para a de 2000 (2,7 %).

Os ésteres etílicos dos ácidos gordos representam $11,2 \pm 4,5$ % da totalidade da fracção volátil livre dos mostos das diferentes castas, considerando as três vindimas em análise. Em termos percentuais, verificou-se um ligeiro decréscimo deste grupo de compostos, da vindima de 1998 ($11,2 \pm 4,1$ %) para a vindima de 1999 ($10,7 \pm 4,1$ %) mantendo-se praticamente constante na vindima de 2000 ($10,3 \pm 4,2$ %).

Tendo em conta os três anos estudados, os mostos da casta *Malvazia* são os que apresentam, em média, as percentagens mais elevadas de ésteres etílicos de ácidos gordos ($16,5 \pm 0,5$ %) contrariamente aos mostos da casta *Boal* que possuem os valores percentuais mais baixos ($5,7 \pm 0,8$ %). Os mostos da casta *Sercial* contribuem com $10,1 \pm 1,1$ %, enquanto que, nos mostos da casta *Verdelho* a percentagem deste grupo de compostos para a totalidade da fracção livre aromática é de $12,6 \pm 0,2$ % (figura 3.26).

Considerando as três vindimas efectuadas, os compostos monoterpénicos representam, aproximadamente, $10,2 \pm 3,0$ %, da fracção livre aromática dos mostos das diferentes castas estudadas. Dos mostos estudados são os da casta *Sercial* que apresentam uma contribuição mais elevada ($14,4 \pm 1,5$ %) para a totalidade da fracção livre aromática. Nos mostos da casta *Boal* a contribuição para o total da fracção livre é de apenas $7,1 \pm 0,7$ %. Para os mostos das castas *Malvazia* e *Verdelho*, a contribuição dos compostos monoterpénicos para a fracção livre aromática é de $10,5 \pm 0,4$ % e $8,7 \pm 0,3$ %, respectivamente.

Dos restantes grupos, os acetatos de álcoois superiores representam $2,3 \pm 1,3$ %, do total da fracção livre volátil, nas três vindimas estudadas. Os mostos da casta *Malvazia* são os mais ricos neste tipo de compostos ($4,2 \pm 0,3$ %) contrariamente aos mostos da casta *Sercial* ($0,7 \pm 0,02$ %) (tabela 3.7).

Os compostos carbonilados (Ald/Cet) contribuem, para as três vindimas, com uma percentagem média de $2,5 \pm 1,6$ %, para a totalidade da fracção livre aromática. Os mostos das castas *Boal* e *Sercial* são os que apresentam uma contribuição mais elevada para a fracção livre total, $4,2 \pm 0,7$ % e $3,6 \pm 1,2$ %, respectivamente. A contribuição deste grupo de compostos para a fracção livre aromática dos mostos das castas *Malvazia* e *Verdelho* é insignificante, $1,9 \pm 0,3$ % para os primeiros e $0,4 \pm 0,08$ % para os segundos.

No que se refere aos fenóis voláteis, são igualmente os mostos das castas *Boal* e *Sercial* os que apresentam a contribuição mais elevada para a totalidade da fracção livre aromática, $3,7 \pm 0,9$ % e $2,6 \pm 0,8$ %, respectivamente. Relativamente aos furanos, são nos mostos *Sercial* cuja contribuição é mais significativa, $1,1 \pm 0,4$ %.

A análise detalhada da tabela 3.7, permite verificar que em termos percentuais, e considerando as áreas relativas de cada composto (expressas em função do padrão interno – octan-3-ol), os mostos da casta *Boal* são mais ricos que os mostos das outras castas estudadas em ácidos gordos voláteis ($19,6\pm 2,7\%$), aldeídos/cetonas ($4,2\pm 0,7\%$) e fenóis voláteis ($3,7\pm 0,9\%$). Os mostos da casta *Malvazia* são os que apresentam percentagens relativas mais elevadas em acetatos de álcoois superiores ($4,2\pm 0,1\%$), ésteres etílicos de ácidos gordos ($16,5\pm 0,5\%$) e norisoprenóides em C_{13} ($1,4\pm 0,2\%$). As percentagens em álcoois superiores ($59,5\pm 1,7\%$) são mais elevadas nos mostos da casta *Verdelho*, enquanto que, os mostos da casta *Sercial* destacam-se dos mostos das outras castas estudadas, relativamente às percentagens dos monoterpénóis ($14,4\pm 1,8\%$), norisoprenóides em C_{13} ($1,4\pm 0,1\%$) e dos compostos furânicos ($1,1\pm 0,2\%$).

A figura 3.26, permite visualizar o perfil dos diferentes grupos de compostos aromáticos nos mostos das castas estudadas.

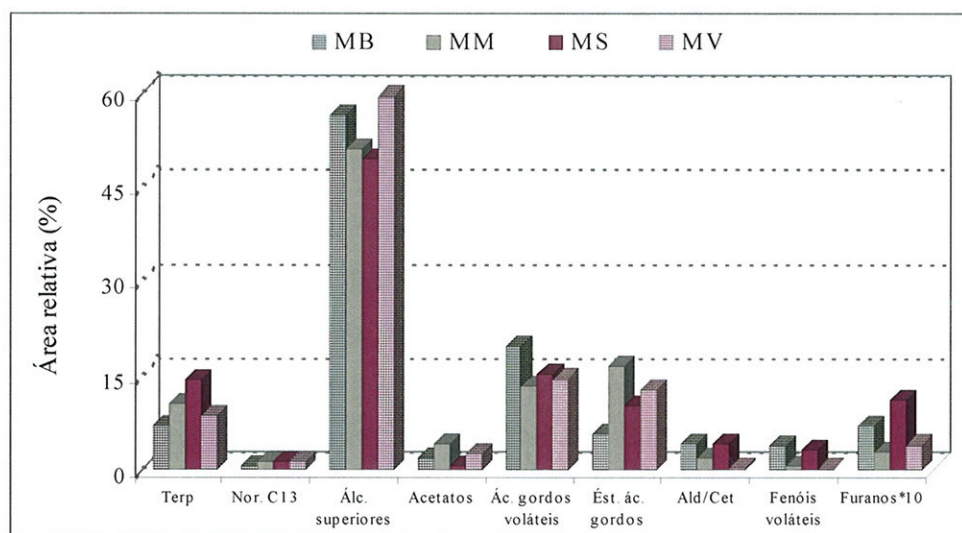


Figura 3.26 – Comparação, em termos de áreas relativas, da distribuição da fracção livre total de cada grupo de compostos aromáticos, nos mostos das diferentes castas estudadas. Valores médios obtidos para as três vindimas (1998, 1999 e 2000).

Na figura 3.27 mostra-se a variação do total da fracção livre aromática, em cada ano de vindima, nos mostos da diferentes castas estudadas, podendo verificar-se que

não existem diferenças estatisticamente significativas, em termos na totalidade da fracção livre aromática, entre os mostos das diferentes castas estudadas.

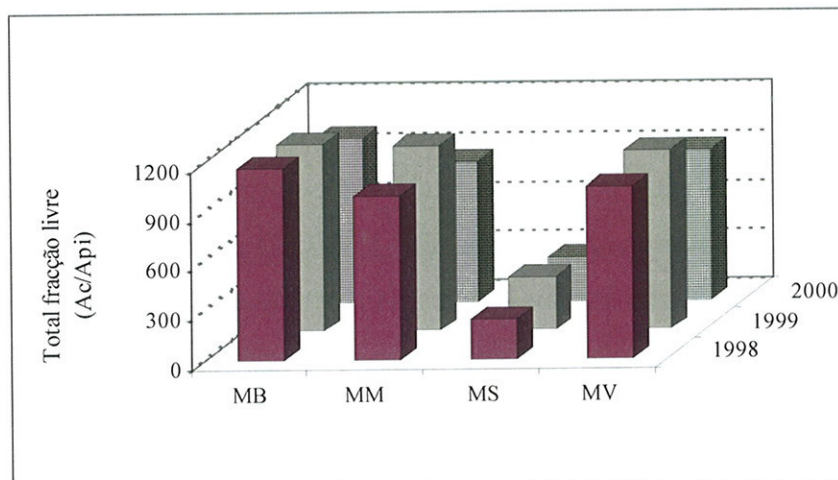


Figura 3.27 – Variação da fracção livre aromática total dos mostos das diferentes castas, nas três vindimas efectuadas.

Em termos de áreas totais relativas dos compostos da fracção livre volátil, verificou-se um ligeiro aumento da vindima de 1998 para a de 1999 (2,7 %) seguido de um decréscimo da vindima de 1999 para a de 2000 (6,5 %). As razões deste comportamento estão relacionadas, principalmente, com as variações verificadas nos álcoois superiores, ácidos gordos voláteis e ésteres etílicos dos ácidos gordos.

O facto das uvas serem provenientes da mesma região geográfica aliado ao facto dos vinhos terem sido vinificados com técnicas semelhantes, podem justificar a variação, pouco significativa, dos teores de cada grupo de compostos aromáticos, nas três vindimas estudadas.

Verificou-se que para os mostos das castas *Boal* e *Verdelho*, o valor do quociente entre as áreas relativas do acetato de 2-feniletilo e da β -damascenona é superior à unidade, $6,9 \pm 1,2$ e $3,8 \pm 0,6$, respectivamente (tabela 3.10).

Para os mostos das castas *Malvazia* e *Sercial* o valor do quociente é inferior à unidade, em média $0,5 \pm 0,06$ e $0,3 \pm 0,01$. Este facto pode ser importante na diferenciação dos mostos das castas *Boal* e *Verdelho* dos mostos das outras castas.

Os mostos das castas *Boal* pelo valor relativamente elevado que lhes corresponde, $6,9 \pm 1,2$, pode igualmente diferenciar-se dos mostos da casta *Verdelho* através da relação *acetato de 2-feniletilo*/ β -damascenona (tabela 3.10).

Tabela 3.10 Valores dos quocientes entre o acetato de 2-feniletilo e a β -damascenona e entre os isómeros (*Z*) e (*E*) do hex-3-en-1-ol, para os mostos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*.

Casta	Ano	acetato de 2-feniletilo / β -damascenona	(<i>Z</i>)-hex-3-en-1-ol / (<i>E</i>)-hex-3-en-1-ol
Boal	1998	$5,9 \pm 1,2$	$0,7 \pm 0,09$
	1999	$8,3 \pm 1,9$	$1,1 \pm 0,1$
	2000	$6,7 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,3$
Malvazia	1998	$0,4 \pm 0,1$	$25,2 \pm 3,6$
	1999	$0,5 \pm 0,2$	$27,6 \pm 4,2$
	2000	$0,5 \pm 0,1$	$23,2 \pm 4,7$
Sercial	1998	$0,2 \pm 0,06$	$0,8 \pm 0,05$
	1999	$0,3 \pm 0,08$	$0,8 \pm 0,07$
	2000	$0,3 \pm 0,07$	$1,1 \pm 0,03$
Verdelho	1998	$3,8 \pm 1,1$	$3,8 \pm 0,6$
	1999	$3,1 \pm 0,7$	$3,1 \pm 10,4$
	2000	$4,3 \pm 0,9$	$4,7 \pm 10,3$

Idêntica analogia pode ser aplicada à razão das áreas relativas dos isómeros (*Z*) e (*E*) do hex-3-en-1-ol. Para os mostos da casta *Boal* a razão entre os isómeros variou entre 0,7 e 1,1, para os mostos da casta *Malvazia* entre 23,2 e 27,6, e para os mostos das castas *Sercial* e *Verdelho* a variação do quociente verificou-se entre 0,8 – 1,1 e 3,1-4,7, respectivamente.

Os valores do quociente dos isómeros (*Z*) e (*E*) do hex-3-en-1-ol permitem-nos pois diferenciar entre os mostos da casta *Malvazia* dos mostos das outras castas.

Os mostos da casta *Verdelho* pelo valor que lhes corresponde, ($3,8 \pm 0,8$), podem igualmente diferenciar-se dos mostos das outras castas através da relação (*Z*)-hex-3-en-1-ol/(*E*)-hex-3-en-1-ol.

Este facto deverá ser explorado futuramente com um maior número de amostras, e eventualmente através de estudos interlaboratoriais.

Os extractos dos cromatogramas SIM da figura 3.28, permitem visualizar as diferenças entre os picos dos compostos em causa. Verificou-se que nos mostos da

casta *Sercial* o pico correspondente à β -damascenona é superior ao do acetato de 2-feniletilo, enquanto que, nos mostos da casta *Verdelho* observou-se o inverso (figura 3.28 A).

A figura 3.28 B, mostra que nos mostos da casta *Boal*, os picos dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol apresentam uma altura similar, e por isso, teores da mesma ordem de grandeza, enquanto que, nos mostos da casta *Malvazia* é notória a diferença na altura dos picos entre o (*Z*)-hex-3-en-1-ol e o (*E*)-hex-3-en-1-ol.

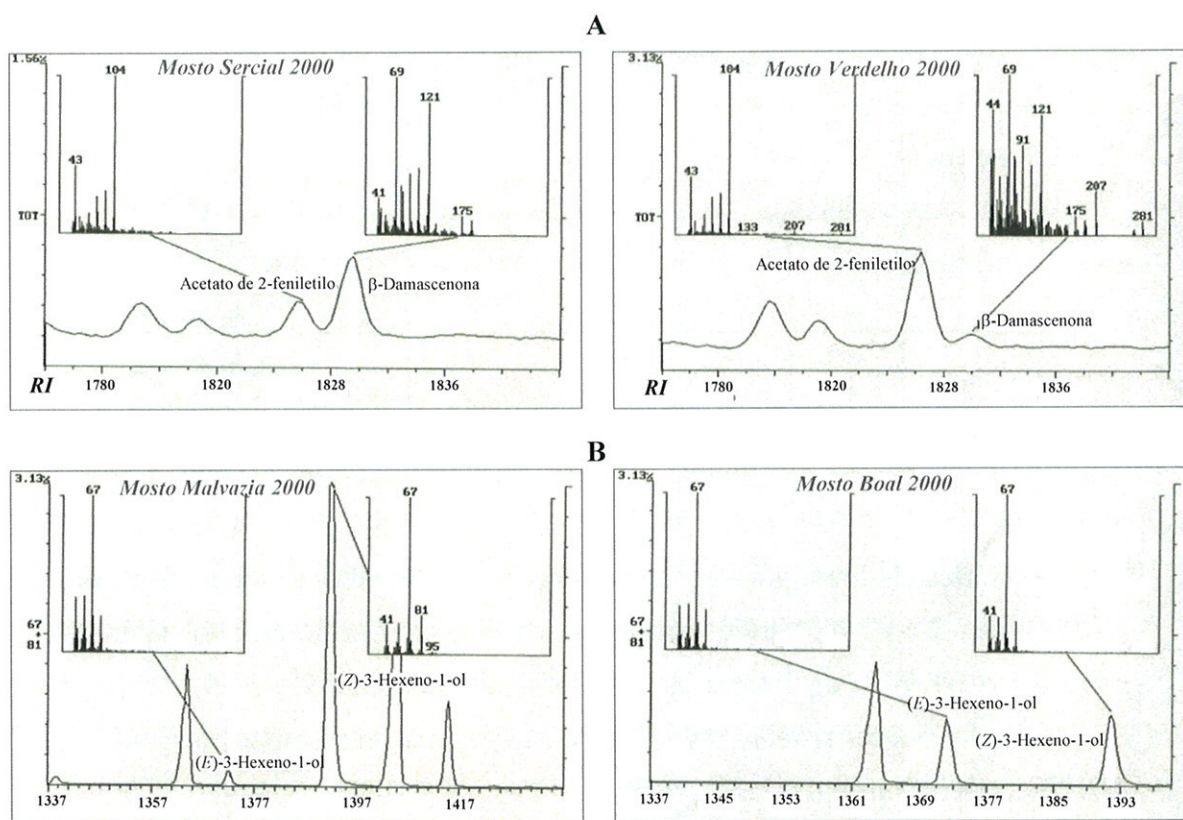


Figura 3.28 – Extractos de cromatogramas (SIM; $m/z=67+81$) de diferentes mostos evidenciando as diferenças existentes entre o acetato de 2-feniletilo e a β -damascenona –A; e entre os isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol –B.

Os resultados obtidos parecem assim indicar a possibilidade de diferenciar os mostos destas castas através dos quocientes dos pares acetato de 2-feniletilo/ β -damascenona e (*Z*)-hex-3-en-1-ol/(*E*)-hex-3-en-1-ol.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO LIVRE AROMÁTICA DOS VINHOS DAS CASTAS *BOAL*, *MALVAZIA*, *SERCIAL* E *VERDELHO*

Com a finalidade de avaliarmos a existência ou não de diferenças fundamentais na constituição dos vinhos monovarietais referentes às vindimas de 1998, 1999 e 2000, efectuámos a caracterização sumária destas amostras.

Os parâmetros que fizeram parte desta caracterização foram, a massa volúmica, o pH, o título alcoolométrico volúmico adquirido, os teores de dióxido de enxofre livre e total, a acidez total, fixa e volátil, o teor de açúcares redutores e totais e o extracto seco total. Os resultados destas análises encontram-se registados na tabela 3.11.

Tabela 3.11 *Valores mínimos, máximos e médios dos parâmetros da análise sumária, por castas.*

Casta		Massa volúmica (20 °C)	pH	TA (% vol.)	SO ₂ (mg.L ⁻¹)		Acidez (g.L ⁻¹)			Açúcares (g.L ⁻¹)		Extracto seco (g.L ⁻¹)
					livre	total	volátil	fixa	total	redutores	totais	
Boal	Mín.	1,0123	3,6	16,7	3,1	9,5	0,2	4,1	4,5	32,2	87,8	83,6
	Máx.	1,0164	3,7	16,9	4,2	12,2	0,6	4,9	5,1	25,7	91,4	90,2
	\bar{x}	1,0144	3,7	16,8	3,7	10,9	0,4	4,5	4,8	28,9	89,6	86,9
Malvazia	Mín.	1,0033	3,4	17,2	3,3	9,0	0,3	5,3	5,8	32,8	149,3	90,1
	Máx.	1,0154	3,5	21,1	4,3	13,1	0,4	6,1	6,4	34,6	158,1	104,8
	\bar{x}	1,0094	3,4	19,2	3,8	11,1	0,3	5,7	6,1	33,7	153,7	97,5
Sercial	Mín.	0,9838	3,1	16,8	3,1	7,2	0,4	6,2	6,8	7,1	26,3	24,4
	Máx.	0,9865	3,4	17,0	4,2	10,0	0,5	8,0	8,6	10,5	19,9	37,5
	\bar{x}	0,9852	3,3	16,9	3,7	8,6	0,4	7,1	7,7	8,8	23,1	31,0
Verdelho	Mín.	0,9991	3,3	15,8	3,0	10,0	0,4	4,0	5,5	24,8	71,3	61,3
	Máx.	1,0064	3,7	17,9	4,9	11,2	1,3	5,4	5,8	26,5	75,9	73,0
	\bar{x}	1,0028	3,5	16,9	3,9	10,6	0,9	4,7	5,7	25,7	73,6	67,2

Mín – mínimo; Máx – máximo; \bar{x} - média; TA – teor alcoólico

Na globalidade das amostras estudadas (tabela 3.11), os parâmetros da análise sumária encontrados podem considerar-se normais para este tipo de vinhos, com o teor alcoólico a variar entre 17 e 19 % (vol.).

Nos vinhos das diferentes castas estudadas, *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, os compostos voláteis foram extraídos e identificados de acordo com as condições dos quadros I e II, respectivamente.

Identificaram-se cerca de 9 dezenas de compostos aromáticos, englobando 12 monoterpenos (terpenos e álcoois monoterpénicos), 5 norisoprenóides em C_{13} (um dos quais desconhecido), 14 álcoois superiores, 3 acetatos de álcoois superiores, 14 ácidos gordos voláteis, 12 ésteres etílicos de ácidos gordos, 7 ésteres etílicos de ácidos fixos, 3 compostos carbonilados, 4 fenóis voláteis, 5 furanos, e outros que não se enquadram em nenhum dos grupos casos do non-1-eno e do benzotiazol.

Na figura 3.29, representa-se um cromatograma de corrente iónica total, dos compostos voláteis da fracção livre de uma amostra de vinho da casta *Malvazia* da vindima de 2000.

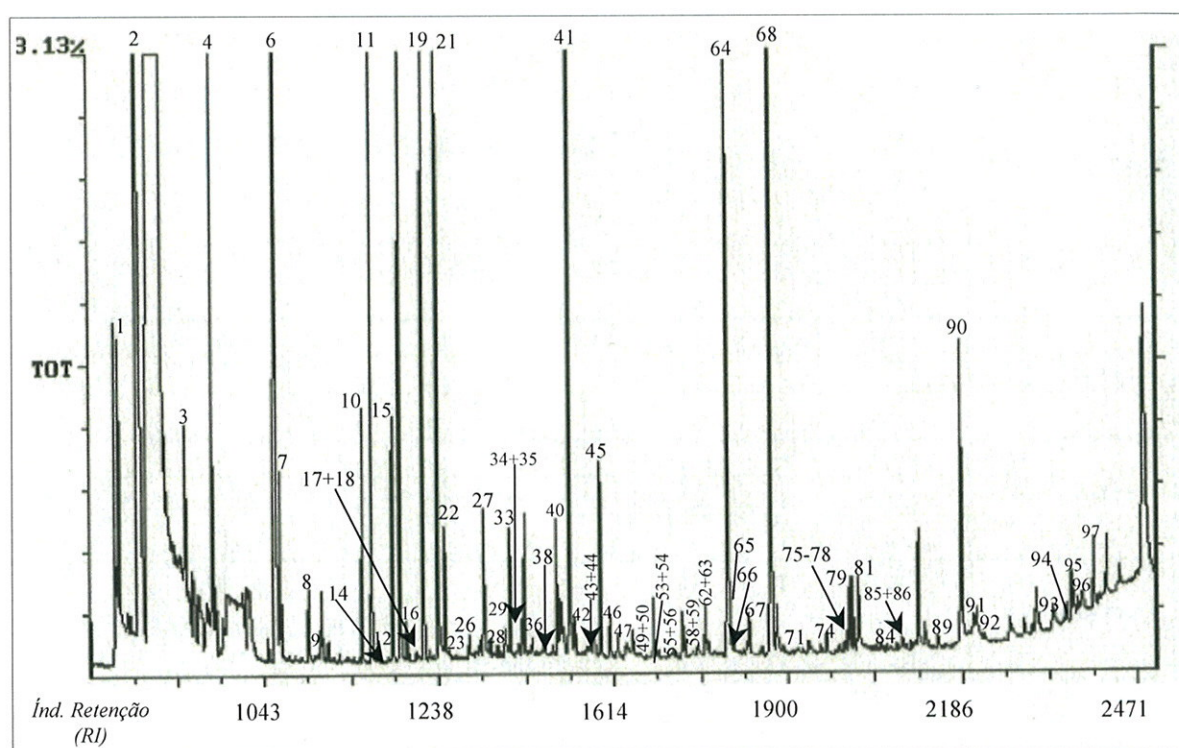


Figura 3.29 – Cromatograma GC-MS de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000, resultante da extração por HS-SPME com fibra de poliacrilato, de acordo com as condições dos quadros I e II. A identificação dos compostos encontra-se na tabela 3.12.

Alguns dos compostos identificados nos mostos não estão presentes nos vinhos respectivos, pelo menos em concentrações que possibilitem a sua identificação com as condições utilizadas.

Dos compostos de origem varietal, o terpine-4-ol, o nerol e a β -ionona não foram identificados em nenhum dos vinhos. O mesmo se verifica com o nonanal e com o (*E*)-hex-2-enal, pressupondo que estes aldeídos terão sido reduzidos pela actividade *álcool desidrogenase* das leveduras. Verificou-se simultaneamente um aumento substancial das áreas relativas do (*Z*)-hex-3-en-1-ol e essencialmente do hexan-1-ol dos mostos para os vinhos. Por outro lado, as áreas relativas dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-2-en-1-ol diminuíram significativamente, não tendo sido detectado o (*Z*)-hex-2-en-1-ol nos vinhos *Malvazia* e *Verdelho*.

Na tabela 3. AA (pág. 280) estão registados os valores médios ($n=3$) obtidos para os diferentes grupos químicos, nos vinhos monovarietais das castas estudadas com 8 meses de conservação, relativos às vindimas de 1998, 1999 e 2000. São apresentados os valores médios ($n=3$) das áreas relativas, (Ac/Api), de cada composto e o intervalo de confiança (95 %) para os compostos identificados.

As percentagens dos diferentes grupos de compostos aromáticos determinadas para os vinhos das castas estudadas, exceptuando o hexan-1-ol, distribuem-se como assinalado na tabela 3.13.

Tabela 3.13 Percentagens médias* de cada grupo de compostos aromáticos da fracção livre dos vinhos das diferentes castas estudadas, referente às vindimas de 1998, 1999 e 2000 (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho).

Grupos de Compostos	VB (%)			VM (%)			VS (%)			VV (%)		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
Terpenos	3,3	2,9	3,4	6,9	4,5	3,7	6,4	5,8	3,8	1,4	1,5	1,4
Norisoprenóides em C ₁₃	0,5	0,6	0,9	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	0,3	0,2	0,3	0,3
Álcoois superiores	76,6	79,3	71,3	41,6	48,2	48,4	43,2	48,6	58,8	44,2	52,5	37,2
Acetatos de álcoois	0,4	0,4	0,2	1,9	1,2	0,8	1,9	1,7	1,2	1,6	1,4	1,5
Ácidos gordos voláteis	3,8	2,9	5,2	4,8	5,0	7,3	7,1	7,7	7,5	4,4	5,4	5,6
Ésteres etílicos ácidos gordos	8,7	8,4	10,2	37,1	34,4	31,1	29,8	26,8	19,7	46,3	37,1	52,4
Ésteres etílicos ácidos fixos	3,6	2,8	4,5	5,8	5,0	6,3	9,9	7,8	7,6	1,0	1,0	0,9
Aldeídos/Cetonas	2,8	2,5	4,0	1,3	1,0	1,6	1,0	0,7	0,8	0,4	0,4	0,3
Fenóis voláteis	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3
Furanos	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0

* $n=3$

Na figura 3.30 apresentam-se, sob a forma de histograma, as percentagens médias de cada grupo de compostos voláteis relativamente ao total da fracção livre

aromática de cada casta, nos vinhos monovarietais com 8 meses de conservação, referentes à vindima de 2000.

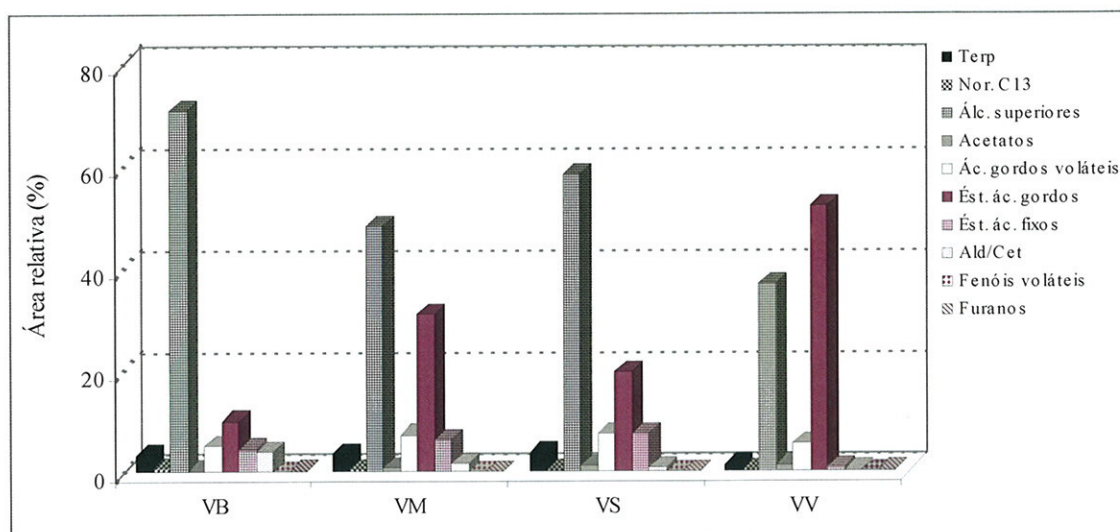


Figura 3.30 – Percentagem dos diferentes grupos de compostos aromáticos da fracção livre do aroma dos vinhos das diferentes castas, referentes à vindima de 2000.

Como se pode verificar os álcoois superiores e os ésteres de ácidos gordos são, em média, os grupos de compostos aromáticos mais abundantes em qualquer dos vinhos das castas estudadas.

A análise detalhada da tabela 3. AA (pág. 280), relativa à fracção livre aromática dos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, permite verificar que em termos percentuais, e considerando as áreas relativas de cada composto (expressas em função do padrão interno, octan-3-ol), os vinhos da casta *Boal* são mais ricos que os vinhos das outras castas em norisoprenóides em C₁₃ ($0,7 \pm 0,17$ %), álcoois superiores ($75,7 \pm 4,1$ %) e compostos carbonilados ($3,1 \pm 0,8$ %). Os vinhos da casta *Malvazia* são os que apresentam percentagens relativas mais elevadas de compostos monoterpénicos ($5,1 \pm 1,6$ %).

As percentagens dos acetatos de álcoois superiores ($1,6 \pm 0,3$ %), dos ácidos gordos voláteis ($7,4 \pm 0,3$ %), dos ésteres etílicos dos ácidos fixos ($8,4 \pm 1,2$ %) e dos fenóis voláteis ($0,17 \pm 0,05$ %), são mais elevadas nos vinhos da casta *Sercial*, enquanto que, os vinhos da casta *Verdelho* destacam-se dos vinhos das outras castas estudadas,

relativamente às percentagens dos ésteres etílicos de ácidos gordos ($45,3 \pm 7,7$ %) e dos compostos furânicos ($0,34 \pm 0,05$ %).

A figura 3.31, permite visualizar o perfil de cada grupo de compostos aromáticos, nos vinhos das diferentes castas estudadas.

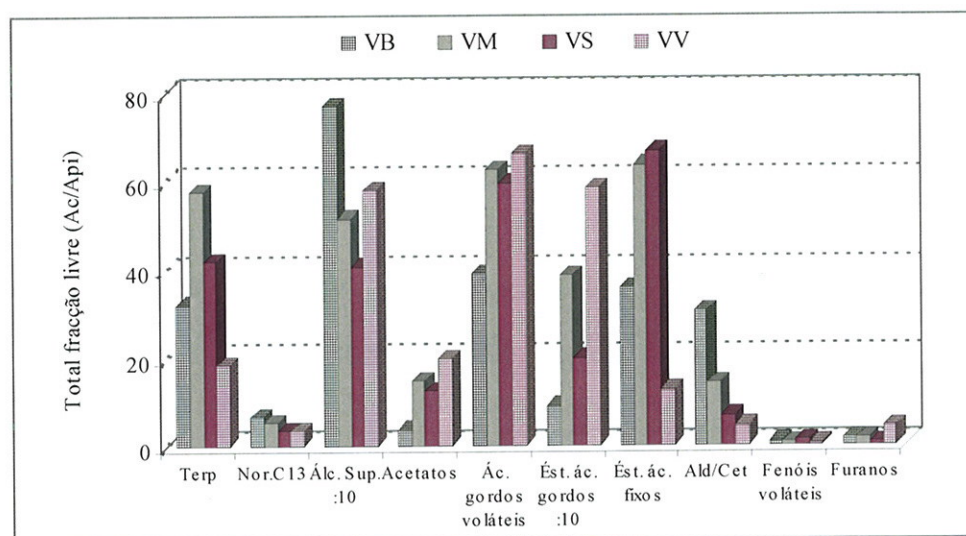


Figura 3.31 - Comparação, em termos de áreas relativas, da distribuição da fracção livre total de cada grupo de compostos aromáticos, nos vinhos das diferentes castas estudadas. Valores médios obtidos para as três vindimas.

Para os vinhos das castas *Boal*, *Malvazia*, e *Verdelho* a totalidade da fracção livre aromática (somatório das razões das áreas – Ac/Api, para todos os compostos), considerando as três vindimas, perfaz em média, uma razão de $1011,4 \pm 169,0$, $1120,6 \pm 147,1$ e $1294,6 \pm 110,1$, respectivamente. Estes valores são significativamente superiores aos obtidos para os vinhos da casta *Sercial*, $799,2 \pm 117,8$.

A figura 3.32 mostra a variação da totalidade da fracção livre aromática nos vinhos das diferentes castas estudadas, podendo corroborar a grande diferença existente, principalmente, entre o total da fracção livre dos vinhos da casta *Verdelho* e *Sercial*.

Esta diferença, deve-se fundamentalmente, aos baixos valores das áreas relativas dos álcoois superiores obtidos para os vinhos da casta *Sercial* comparativamente aos vinhos das restantes castas estudadas.

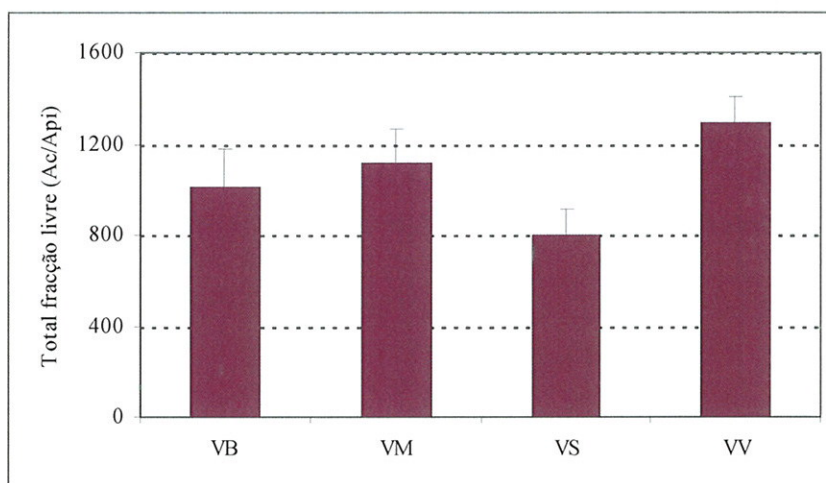


Figura 3.32 – Total da fracção livre aromática nos vinhos das diferentes castas estudadas.

3.5.1 Monoterpenóis e norisoprenóides em C₁₃

A contribuição média dos monoterpenóis para a totalidade da fracção livre aromática nas três vindimas, é de $3,7 \pm 1,4$ %. Os vinhos das castas *Malvazia* ($5,1 \pm 1,6$ %) e *Sercial* ($5,3 \pm 1,3$ %) são os mais ricos neste tipo de compostos. Para os vinhos das castas *Boal* e *Verdelho*, a contribuição dos monoterpenóis para a fracção livre aromática é de $3,2 \pm 0,3$ % e $1,4 \pm 0,06$ %, respectivamente.

Os norisoprenóides em C₁₃ constituem uma fracção ínfima, apenas $0,5 \pm 0,2$ %, do total da fracção livre aromática nos vinhos das castas estudadas. Dado os baixos limiares de percepção olfactiva que lhes é atribuída, podem contribuir para o aroma dos vinhos, mesmo encontrando-se em concentrações muito baixas. Os vinhos da casta *Boal* contribuem com $0,7 \pm 0,2$ %. No que se refere aos vinhos das restantes castas a contribuição é ainda menor, $0,5 \pm 0,1$ %, $0,4 \pm 0,1$ % e $0,3 \pm 0,02$ %, respectivamente, para os vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*.

As tabelas 3.3 e 3.4 permitem constatar, que alguns compostos de origem varietal, nomeadamente a β -damascenona, são mais abundantes nos vinhos monovarietais do que nos mostos que os originaram. Tal poderá ser interpretado, por um lado, pela hidrólise ácida e/ou enzimática dos precursores glicosilados e, por outro, pelos rearranjos químicos, ao pH ácido do mosto e do vinho, sofridos por alguns compostos presentes na forma livre.

Os valores percentuais, deste grupo de compostos diminuem da vindima de 1998 ($4,5 \pm 2,6$ %) para a de 1999 ($3,7 \pm 1,9$ %) e desta para a de 2000 ($3,1 \pm 1,1$ %).

Na figura 3.33 está representada a evolução da percentagem relativa dos monoterpenóis e norisoprenóides, para as três vindimas efectuada, das diferentes castas produtoras de vinho Madeira.

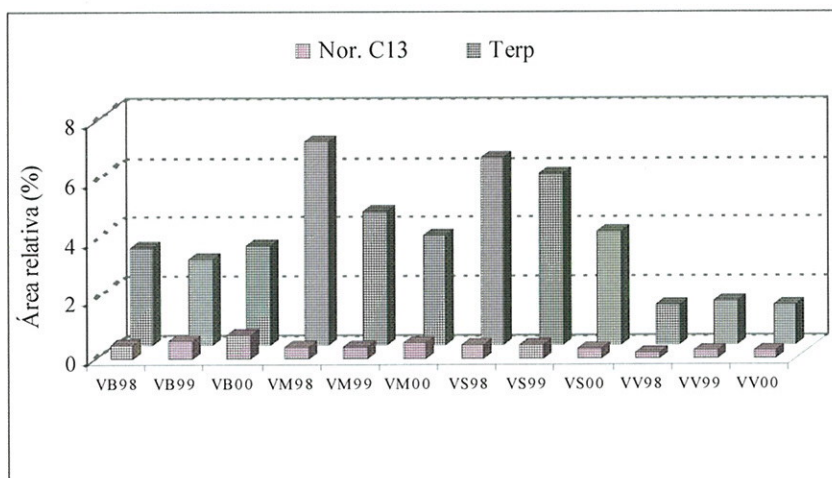


Figura 3.33 – Variação da percentagem relativa dos norisoprenóides (Nor C13) e monoterpenóis (Terp) referente às três vindimas, para as diferentes castas estudadas.

Como se pode comprovar pelo gráfico, em qualquer dos vinhos das castas estudadas, a percentagem de norisoprenóides mantém-se praticamente constante para as três vindimas.

No que concerne aos monoterpenóis, verificou-se uma diminuição gradual das percentagens das áreas relativas, nas vindimas de 1998 a 2000, nos vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial*, mantendo-se praticamente constantes nos vinhos das castas *Boal* e *Verdelho*.

3.5.2 Álcoois superiores

Igualmente ao verificado nos mostos, em qualquer dos vinhos das diferentes castas estudados, os álcoois superiores continuam a ser o grupo de compostos voláteis

mais abundante representando, em média, $54,1 \pm 14,2$ % da fracção aromática livre dos vinhos das quatro castas. A figura 3.34 representa um extracto de um cromatograma SIM ($m/z=56+67+81$) de alguns álcoois superiores, de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

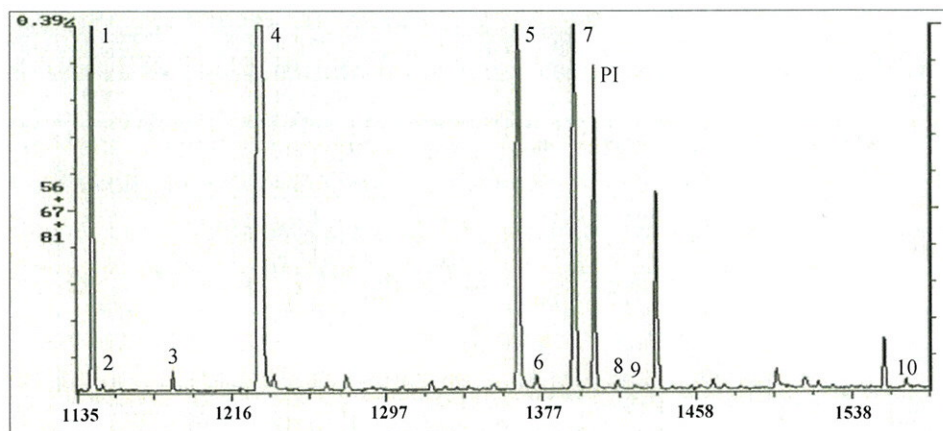


Figura 3.34 – Cromatograma SIM ($m/z=56+67+81$) de alguns álcoois superiores de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

Legenda: 1- butan-1-ol; 2- acetato de hexilo; 3- 4-metilpentan-2-ol; 4- 2+3-metilbutan-1-ol; 5- hexan-1-ol; 6- (E)-hex-3-en-1-ol; 7- (Z)-hex-3-en-1-ol; Padrão Interno (octan-3-ol); 8- (E)-hex-2-en-1-ol; 9- (Z)-hex-2-en-1-ol; 10- nonan-1-ol.

Dos vinhos das diferentes castas estudadas, são os da casta *Boal* que apresentam a contribuição mais significativa, $75,7 \pm 4,1$ %, para a totalidade da fracção livre aromática dos álcoois superiores. Relativamente aos vinhos das outras castas, a contribuição dos álcoois superiores para o total da fracção livre é menos significativa: $46,0 \pm 3,9$ % para os vinhos da casta *Malvazia*, $50,2 \pm 7,9$ % para os vinhos da casta *Sercial* e $44,6 \pm 7,7$ % para os vinhos da casta *Verdelho*. Para estas percentagens contribuem, significativamente, o 2+3-metilbutan-1-ol e o 2-feniletanol que conjuntamente totalizam $92,8 \pm 1,5$ % para a fracção livre dos álcoois superiores nos vinhos da casta *Boal*, $90,5 \pm 1,2$ % nos vinhos da casta *Malvazia*, e $94,0 \pm 1,3$ % e $93,8 \pm 1,3$ % para os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho*, respectivamente.

Verificou-se, no entanto, que em qualquer das vindimas e para qualquer dos vinhos monovarietais estudados, os teores de álcoois superiores determinados, inferiores a 300 mg.L^{-1} , parecem influenciar positivamente o seu aroma (Rapp e Mandery, 1986, Rapp e Versini, 1995).

Na tabela 3.14 estão registados os valores médios determinados para os principais álcoois superiores, presentes nos vinhos das diferentes castas estudadas.

Tabela 3.14 Concentrações médias* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos álcoois superiores nos vinhos das diferentes castas para as três vindimas efectuadas (VB – Vinho Boal; VM – Vinho Malvazia; VS – Vinho Sercial; VV – Vinho Verdelho).

Álcoois superiores	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
2+3-metilbutan-1-ol	19523	22566	8777	14071	16778	12567	9702	10740	19505	23190	26055	14891
butan-1-ol	394,4	406,4	400,4	334,4	288,5	318,7	258,6	207,8	273,2	239,5	295,1	284,3
hexan-1-ol	585,5	520,6	555,0	471,6	531,8	461,5	211,4	182,6	217,9	416,5	381,7	388,9
(E)-hex-3-en-1-ol ¹	17,0	20,5	10,3	4,1	4,6	4,4	2,8	3,0	4,1	7,9	8,8	6,7
(Z)-hex-3-en-1-ol ¹	12,2	13,8	11,3	122,3	138,0	134,1	25,4	23,7	26,1	28,9	32,1	26,3
(E)-hex-2-en-1-ol ¹	2,8	1,9	2,5	4,7	4,9	3,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(Z)-hex-2-en-1-ol ¹	2,7	2,6	1,9	nd	nd	nd	1,2	0,9	1,3	nd	nd	nd
álcool benzílico	257,6	297,6	250,2	59,9	67,7	62,3	25,0	22,8	27,2	33,2	36,5	31,2
2-feniletanol	3874,1	3395,3	3419,6	1460,9	1891,9	1463,3	922,5	1025,8	1120,7	987,9	922,7	929,8

* $n=3$; 1: concentração determinada com o coeficiente de resposta do hexan-1-ol; nd: não detectado nas condições experimentais

Em qualquer dos vinhos das castas analisadas, os álcoois isoamílicos são os que apresentam valores médios mais elevados. Os vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* são os mais ricos em 2- e 3-metilbutan-1-ol, podendo assim deduzir-se que possuem teores mais elevados dos aminoácidos precursores, a leucina e a isoleucina, do que os vinhos das outras castas estudadas.

Embora elevados, os teores estão aquém do limiar de percepção olfactivo ($60.000 \mu\text{g.L}^{-1}$, de acordo com Simpson, 1979) pelo que não devem contribuir para as características aromáticas destes vinhos.

O 2-feniletanol, que pode contribuir para a matiz floral dos vinhos, nomeadamente a “rosas” (Meilgaard, 1975), está presente nos vinhos da casta *Boal* em teores significativamente mais elevados do que os determinados para os vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* (tabela 3.13). Analogamente ao acima referido, pode considerar-se que os vinhos desta casta apresentarão teores do aminoácido precursor deste álcool, a fenilalanina, superiores aos das outras castas estudadas.

Os vinhos da casta *Boal* também se evidenciam pelos elevados teores de álcool benzílico, comparativamente aos vinhos das outras castas. Esta tendência foi verificada

nas três vindimas estudadas. Os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* são os que apresentam teores de 2-feniletanol e de álcool benzílico, mais baixos.

Relativamente ao hexan-1-ol, que confere aos vinhos notas herbáceas quando presente em quantidades superiores a $4000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Simpson, 1979), apresenta os teores mais elevados nos vinhos das castas *Boal* ($553,7 \pm 32,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) e *Malvazia* ($488,3 \pm 38,0 \mu\text{g.L}^{-1}$), inferiores no entanto ao seu limiar de percepção olfativo.

Constata-se ainda, que nos vinhos da casta *Boal*, os teores determinados para os isómeros (*Z*) e (*E*) do hex-2-en-1-ol são similares. Nos vinhos da casta *Malvazia* apenas foi detectado o isómero (*E*) e nos vinhos da casta *Sercial* apenas o isómero (*Z*). Nenhum destes compostos foi detectado nos vinhos da casta *Verdelho*.

O gráfico da figura 3.35 apresenta os valores médios de álcoois superiores alifáticos determinados para os diferentes tipos de vinho Madeira estudados.

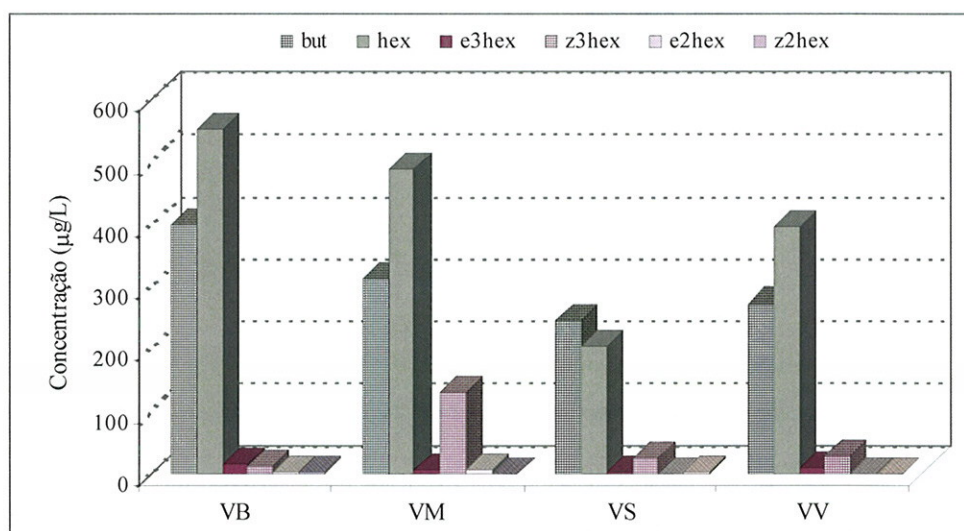


Figura 3.35 - Teores médios de alguns álcoois superiores presentes nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

Legenda: but- butan-1-ol; hex- hexan-1-ol; e3hex- (*E*)-hex-3-en-1-ol; z3hex- (*Z*)-hex-3-en-1-ol; e2hex- (*E*)-hex-2-en-1-ol; z2hex- (*Z*)-hex-2-en-1-ol.

Em média, e considerando as quatro castas, a percentagem de álcoois superiores determinada para a vindima de 1999 ($57,1 \pm 8,3 \%$) é ligeiramente superior à determinada para as vindimas de 1998 ($51,4 \pm 9,1 \%$) e 2000 ($53,9 \pm 7,5 \%$) (figura 3.31).

Ao comparar a percentagem da área relativa dos álcoois superiores nas três vindimas efectuadas e para as quatro variedades de vinhos estudadas (figura 3.36), pode constatar-se que esta se mantém praticamente constante nos vinhos das castas *Boal* e *Malvazia*, o mesmo não acontecendo com vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho*. Nestes, verificaram-se variações significativas entre a vindima de 1999 e 2000, com um incremento da percentagem da área relativa de $10,2 \pm 2,1$ % nos vinhos *Sercial* e um decréscimo de $15,4 \pm 1,7$ % nos vinhos da casta *Verdelho*. Na vindima de 1998 para a de 1999 verificou-se um aumento na percentagem da área relativa nos vinhos das duas castas, de $5,4 \pm 0,9$ % nos vinhos *Sercial* e de $8,3 \pm 0,9$ % nos vinhos *Verdelho*. A figura 3.36 permite visualizar estas variações.

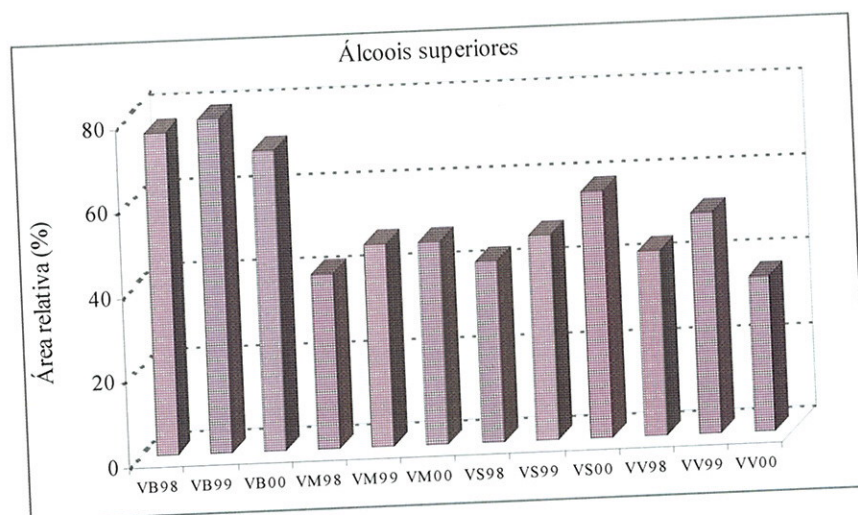


Figura 3.36 – Variação da percentagem relativa dos álcoois superiores nas três vindimas, para cada casta estudada.

A análise da tabela 3.14 permite verificar que a abundância relativa dos isómeros (*Z*) e (*E*) do hex-3-en-1-ol varia com a casta, sendo o isómero (*Z*) sempre superior ao isómero (*E*) para os vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*. Para os vinhos da casta *Boal*, a abundância relativa é similar.

Pode verificar-se ainda que o valor do quociente entre o isómero (*Z*) e o isómero (*E*) é aproximadamente constante para os vinhos da cada casta (tabela 3.15).

Para os vinhos *Boal* a razão entre os isómeros variou entre 0,9 e 1,2, para os vinhos *Malvazia* entre 29,9 e 30,2, e para os vinhos *Sercial* e *Verdelho* a variação do quociente verificou-se entre 6,4 e 9,1 e 3,7 e 3,9, respectivamente.

Tabela 3.15 Valores do quociente entre os isómeros (Z) e (E) do hex-3-en-1-ol para os vinhos das castas estudadas.

Castas	Ano	(Z)-hex-3-en-1-ol / (E)-hex-3-en-1-ol
Boal	1998	0,9±0,1
	1999	0,9±0,1
	2000	1,2±0,1
Malvazia	1998	29,9±1,9
	1999	30,2±2,1
	2000	30,3±2,7
Sercial	1998	9,1±1,1
	1999	7,9±1,6
	2000	6,4±1,3
Verdelho	1998	3,7±1,2
	1999	3,8±1,3
	2000	3,9±1,1

Os resultados obtidos parecem assim indicar a possibilidade de diferenciar os vinhos destas castas através dos quocientes dos dois isómeros do hex-3-en-1-ol. Versini *et al.*, (1994) encontraram valores médios de 2,5 e 0,3 em vinhos das castas *Loureiro* e *Alvarinho*, respectivamente, indicando a predominância do isómero (Z) na casta *Alvarinho*.

A figura 3.37 permite visualizar as diferentes alturas dos picos dos isómeros (Z) e (E) do hex-3-en-1-ol para os vinhos das castas *Boal* e *Malvazia*.

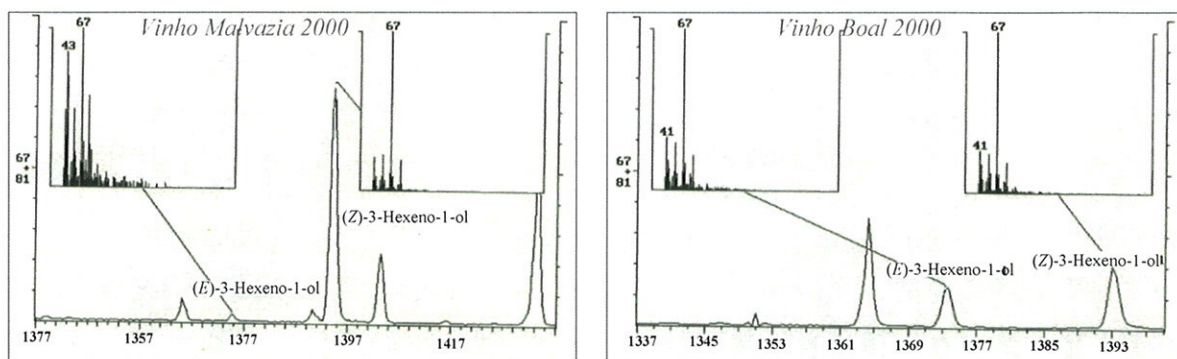


Figura 3.37 – Extracto de um cromatograma (SIM: $m/z=67+81$) de um vinho Boal e Malvazia com a identificação dos picos correspondentes ao (E)-hex-3-en-1-ol e ao (Z)-hex-3-en-1-ol.

Outras castas, tais como a *Gewürztraminer* (Versini *et al.*, 1990) e a *Muscat d'Alexandrie* (Aubert *et al.*, 1997) originam vinhos com predominância do isómero (*E*).

Analogamente ao referido para os mostos, estas observações deverão ser confirmadas com um maior número de amostras e, idealmente, através da realização de ensaios interlaboratoriais.

3.5.3 Ácidos gordos voláteis

Os ácidos gordos voláteis representam, em média, $5,6 \pm 1,5$ % da totalidade da fracção livre aromática dos vinhos das quatro castas estudadas, tendo em consideração as três vindimas efectuadas. Em termos percentuais médios, não existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores determinados para os ácidos gordos voláteis nos vinhos das diferentes castas estudadas. Genericamente, os vinhos das castas *Sercial* ($7,4 \pm 0,4$ %) e *Malvazia* ($5,7 \pm 1,4$ %) apresentam teores um pouco mais elevados do que os vinhos das castas *Verdelho* ($5,2 \pm 0,6$ %) e *Boal* ($4,0 \pm 1,1$ %).

A figura 3.38 representa um extracto de um cromatograma SIM ($m/z=60+87+101$) de ácidos gordos voláteis, de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

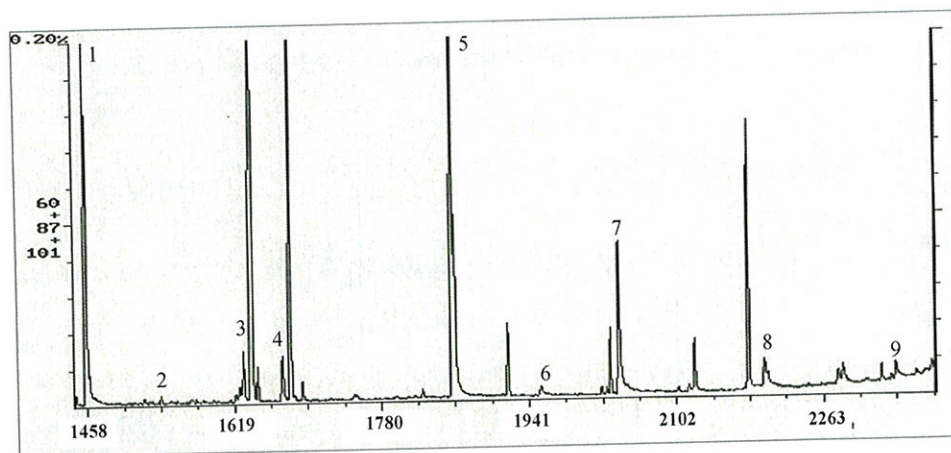


Figura 3.38 – Cromatograma SIM ($m/z=60+87+101$) dos ácidos gordos voláteis de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

Legenda: 1- acético; 2- propanóico; 3- 3-metilbutanóico; 4- butanóico; 5- hexanóico; 6- 2-etil-hexanóico; 7- octanóico; 8- decanóico; 9- dodecanóico.

Na tabela 3.16 estão registados os valores médios dos ésteres etílicos dos ácidos gordos, de cadeia curta e média, para os vinhos das diferentes castas estudadas.

Tabela 3.16 Valores médios das áreas relativas obtidos para os principais ácidos gordos voláteis identificados nos vinhos das diferentes castas.

Ácidos gordos voláteis	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
$\mu\text{g.L}^{-1}$												
ácido hexanóico	43,4	29,0	38,1	144,5	137,1	207,9	96,5	134,8	178,0	450,6	640,8	563,9
ácido octanóico	35,2	26,4	22,5	112,7	123,2	135,9	578,8	664,6	807,8	763,9	656,7	541,3
Ac/Api												
ácido acético	16,0	15,9	16,3	26,7	27,1	27,5	20,0	20,5	27,1	15,1	17,2	19,1
ácido propanóico	1,0	0,07	0,08	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ácido butanóico	2,2	1,1	1,6	1,5	2,0	1,9	0,7	1,1	1,3	0,9	0,6	1,4
ácido 3-metilbutanóico	1,8	0,8	1,2	1,7	1,7	1,5	1,1	1,0	1,2	0,6	1,0	0,6
ácido 2-hidroxibenzenopropanóico	2,4	1,6	2,7	4,0	3,0	4,5	1,7	1,1	1,3	0,2	0,2	0,4
ácido 2-etil-hexanóico	1,1	0,08	0,09	0,5	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
ácido nonanóico	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,2	0,2	0,4
ácido decanóico	3,0	1,9	3,2	2,9	3,1	2,5	4,5	3,8	4,7	2,3	2,1	3,0
ácido benzóico	3,3	2,3	4,0	4,0	3,7	3,4	0,8	0,7	0,8	0,5	0,4	0,7
ácido dodecanóico	1,6	0,4	1,2	1,6	1,2	1,8	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,3

*n=3

Exceptuando o ácido acético, os ácidos gordos que mais contribuem para estes valores percentuais são os ácidos hexanóico, octanóico e decanóico. Os vinhos *Verdelho* são os que apresentam teores mais elevados destes três compostos. Conjuntamente totalizam $90,9 \pm 1,4$ % da fracção livre aromática dos ácidos gordos nos vinhos desta casta. Relativamente aos vinhos das outras castas as percentagens são de $20,6 \pm 1,6$, $37,8 \pm 3,0$ e $79,2 \pm 2,1$ %, para os vinhos *Boal*, *Sercial* e *Malvazia*, respectivamente.

A concentração do ácido hexanóico varia significativamente em função da casta e do ano de vindima (tabela 3.16). Os vinhos da casta *Boal* são os que apresentam as concentrações mais baixas ($36,8 \pm 7,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) deste ácido, contrariamente aos vinhos da casta *Verdelho* ($551,8 \pm 95,6 \mu\text{g.L}^{-1}$). Para os vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial*, a concentração média determinada para o ácido hexanóico foi de $163,2 \pm 38,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de $136,5 \pm 40,7 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (figura 3.39).

Os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* são os mais ricos em ácido octanóico, apresentando uma concentração de $683,7 \pm 115,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os primeiros e $654,1 \pm 11,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os segundos, enquanto que, os da casta *Malvazia* apresentam teores mais elevados em ácido hexanóico ($551,8 \pm 95,6 \mu\text{g.L}^{-1}$). Nos vinhos da casta *Boal* foram determinados valores similares para estes dois ácidos, $36,8 \pm 7,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $28,1 \pm 6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (tabela 3.16).

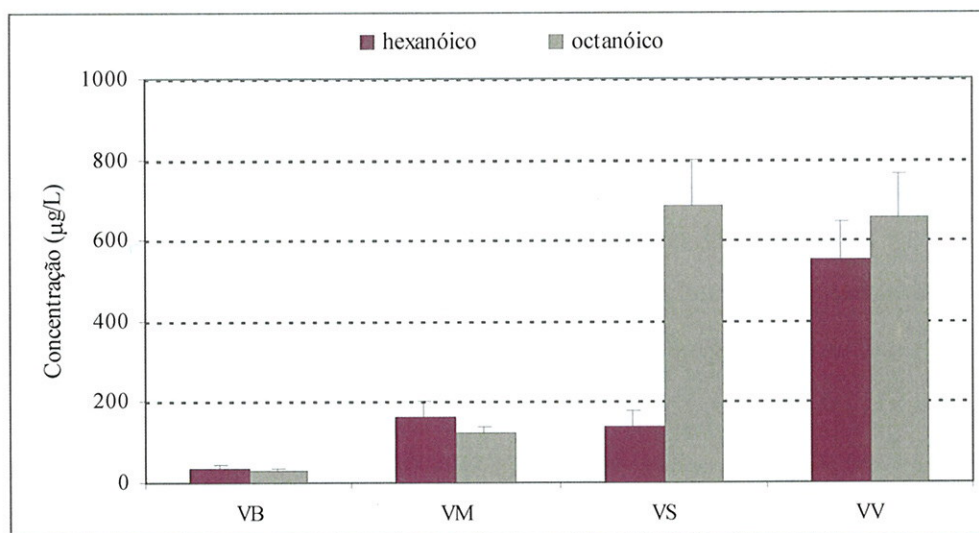


Figura 3.39 – Teores médios ($média \pm desvio\ padrão$) dos ácidos hexanóico e octanóico presentes nas quatro variedades de vinhos Madeira estudadas.

As áreas relativas dos ácidos butanóico e 3-metilbutanóico são muito baixas verificando-se, no entanto, que em qualquer dos vinhos das castas estudadas, as áreas relativas do ácido butanóico são superiores às do ácido 3-metilbutanóico.

Os vinhos produzidos em 1998 são os que, em média, apresentam os teores mais baixos em ácidos gordos voláteis ($5,0 \pm 1,4 \%$). Para as vindimas de 1999 e 2000 a contribuição deste grupo de compostos para a fracção livre foi de $5,3 \pm 2,0 \%$ e $6,4 \pm 1,2 \%$, respectivamente (figura 3.40).

Verificou-se que nos vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* a percentagem das áreas relativas dos ácidos gordos voláteis, nas três vindimas efectuadas, mantém-se praticamente constante. Nos vinhos das castas *Malvazia* e *Boal* não se verificam variações significativas nos teores de ácidos gordos entre as vindimas de 1998 e 1999.

Da vindima de 1999 para a vindima de 2000 observou-se um aumento na percentagem de área relativa nos vinhos destas duas castas, maior nos vinhos da casta *Boal*, 43,2 %, do que nos vinhos da casta *Malvazia*, 31,4 %. A figura 3.40 permite visualizar as variações referidas.

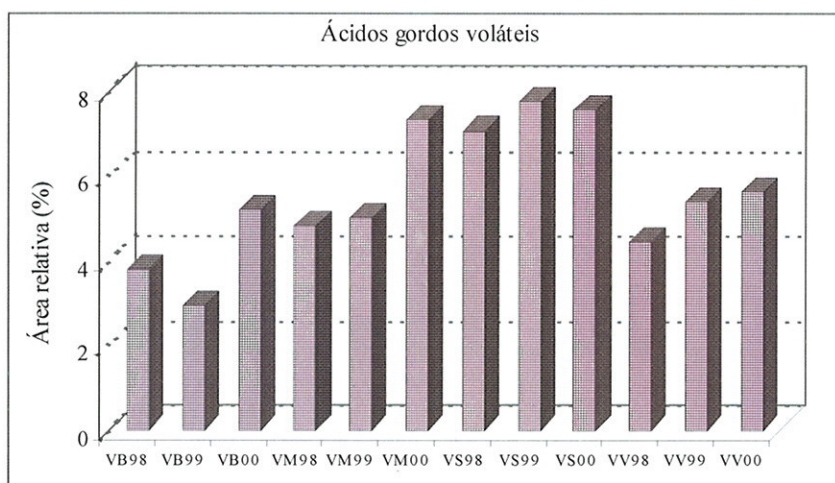


Figura 3.40 – Variação da percentagem relativa dos ácidos gordos voláteis nas diferentes castas produtoras de vinho Madeira para as três vindimas estudadas.

3.5.4 Ésteres

São formados maioritariamente durante o processo fermentativo pelo metabolismo das leveduras e durante a conservação do vinho por esterificação química.

3.5.4.1 Acetatos de álcoois superiores

A reacção de esterificação do ácido acético com alguns álcoois superiores (nomeadamente o 2-metilbutan-1-ol, o hexan-1-ol e o 2-feniletanol) origina os acetatos de álcoois superiores - *acetato de isoamilo*, *acetato de hexilo* e *acetato de 2-feniletilo*, possuidores de odores intensos muito particulares. Participam no aroma dos vinhos de castas neutras, podendo em alguns casos mascarar o aroma varietal. A figura 3.41

mostra as concentrações médias (média±desvio padrão) dos acetatos de álcoois superiores nos vinhos das diferentes castas, nas três vindimas estudadas.

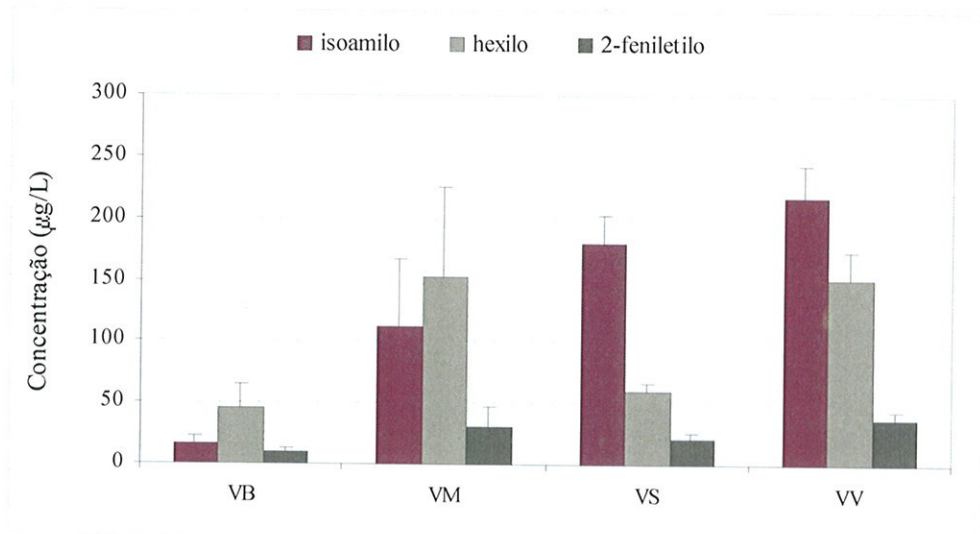


Figura 3.41 – Teores médios (média±desvio padrão) dos acetatos de álcoois superiores identificados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

Verificou-se que dos acetatos de álcoois superiores, o acetato de isoamilo, que proporciona odores “banana”, é o que apresenta teores médios mais elevados, contrariamente ao acetato de 2-feniletilo minoritário em qualquer das castas estudadas.

São os vinhos das castas *Verdelho* e *Sercial* que apresentam, em média, os teores mais elevados em acetato de isoamilo respectivamente, $216,7 \pm 26,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $179,6 \pm 23,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, contrariamente aos vinhos da casta *Boal* com teores médios da ordem dos $16,0 \pm 6,1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os vinhos das castas *Boal* e *Malvazia* são os mais ricos em acetato de hexilo, enquanto que, o acetato de 2-feniletilo é minoritário nos vinhos de qualquer das castas estudadas.

Para um nível de confiança de 95 %, as diferenças observadas entre os valores médios do acetato de 2-feniletilo nos vinhos *Boal* e nos vinhos *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, são estatisticamente significativas.

Relativamente ao ano de vindima, verificou-se um decréscimo gradual destes compostos da vindima de 1998 ($1,5 \pm 0,1$ %) para a de 1999 ($1,2 \pm 0,1$ %) e desta para a de 2000 ($0,9 \pm 0,07$ %). Nos vinhos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho*, a percentagem

de acetatos de álcoois superiores mantém-se praticamente constante para as três vindimas estudadas, contrariamente ao observado nos vinhos da casta *Malvazia* para os quais ocorreu um decréscimo significativo da vindima de 1998 para a de 1999 ($51,4 \pm 2,7$ %) e desta para a de 2000 ($32,5 \pm 10,4$ %)

A figura 3.42 mostra a variação da percentagem relativa nas vindimas de 1998, 1999 e 2000, dos acetatos de álcoois superiores, ésteres etílicos de ácidos gordos e de ácidos fixos.

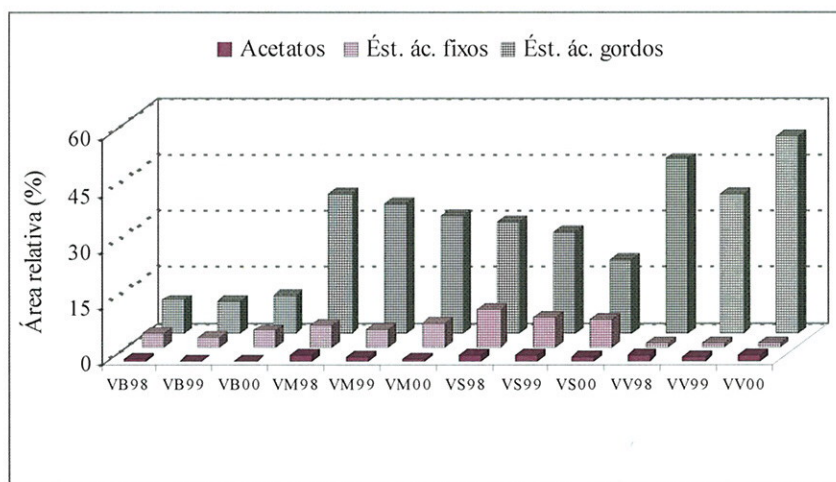


Figura 3.42 – Variação da percentagem relativa dos acetatos de álcoois superiores, dos ésteres de ácidos gordos e de ácidos fixos para cada vindima efectuada, nas diferentes variedades de vinho Madeira.

3.5.4.2 Ésteres etílicos de ácidos gordos

Os ésteres etílicos dos ácidos gordos são formados pelas leveduras, em condições anaeróbias, durante a fermentação alcoólica e, contrariamente à maioria dos ésteres, a sua concentração diminui ao longo da conservação. Participam na *finesse* aromática dos vinhos novos conferindo-lhes aromas agradáveis de “cera” e de “mel”.

A figura 3.43 representa um extracto de um cromatograma SIM ($m/z=88+101+157$) de alguns ésteres etílicos de ácidos gordos, de uma amostra de vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

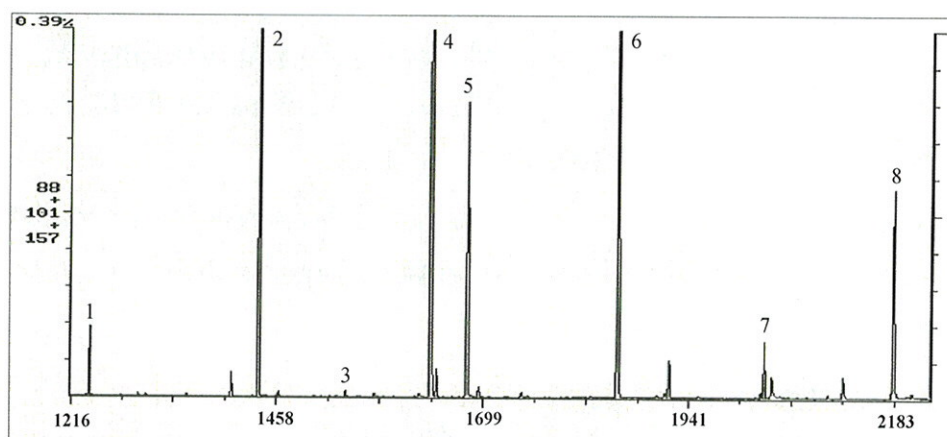


Figura 3.43 – Cromatograma SIM ($m/z=88+101+157$) dos ésteres etílicos de ácidos gordos de uma amostra vinho *Malvazia* da vindima de 2000.

Legenda: 1- hexanoato de etilo; 2- octanoato de etilo; 3- nonanoato de etilo; 4- decanoato de etilo; 5- succinato de dietilo; 6- dodecanoato de etilo; 7- tetradecanoato de etilo; 8- hexadecanoato de etilo.

Constituem o segundo grupo mais abundante nos vinhos das castas estudadas, representando, em média, $28,5 \pm 14,4$ % do total da fracção livre aromática, considerando os três anos.

Os vinhos da casta *Verdelho* são os mais ricos neste tipo de compostos. Para esta casta, da totalidade dos compostos voláteis que constituem a fracção livre, $45,3 \pm 7,7$ % são de ésteres etílicos de ácidos gordos, considerando as três vindimas. Inversamente, são aos vinhos da casta *Boal* que correspondem as percentagens mais baixas deste grupo de compostos, totalizando $9,1 \pm 0,9$ %. Aos vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial* correspondem percentagens que não são significativamente diferentes, $34,2 \pm 3,0$ % para os primeiros e $25,4 \pm 5,2$ % para os segundos.

De entre os ésteres analisados o acetato de etilo é, quantitativamente, o mais abundante (tabela 3.17). Apesar de uma pequena quantidade se formar durante a fermentação alcoólica, a maior parte é proveniente da intervenção de bactérias acéticas, em condições aeróbias, durante a conservação do vinho. É responsável por características olfactivas marcadas por um odor “acre” e “sufocante”. Com um limiar de percepção olfactiva nos vinhos na ordem dos 160 mg.L^{-1} , participa da complexidade aromática favorável à qualidade do vinho entre os 50 e 80 mg.L^{-1} , contrariamente ao sabor a “queimado” quando presente em teores relativamente elevados ($>120 \text{ mg.L}^{-1}$).

Não existem diferenças estatisticamente significativas, entre os teores de acetato de etilo nos vinhos das castas estudadas.

Na tabela 3.17, estão registados os valores médios dos ésteres etílicos dos ácidos gordos para os vinhos das diferentes castas.

Tabela 3.17 Valores médios obtidos para os principais ésteres etílicos dos ácidos gordos.

Ésteres etílicos de ácidos gordos	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$												
acetato de etilo	10949	16051	12915	9780	8079	13766	17486	11587	18602	15839	14191	10311
hexanoato de etilo	103,7	95,6	96,8	112,6	177,7	165,2	455,4	340,4	311,8	685,8	726,4	621,9
octanoato de etilo	108,1	105,0	93,1	415,9	369,0	365,5	582,4	433,7	399,1	1643,5	1101,9	1673,6
decanoato de etilo	391,7	351,5	311,4	1983,7	2051,6	1094,7	461,1	508,4	466,7	2311,9	1566,0	2081,0
Ac/Api												
nonanoato de etilo	3,3	2,9	2,3	1,6	0,9	1,5	0,8	0,5	0,5	1,7	1,1	1,0
benzoato de etilo	0,4	0,5	0,5	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,4
cis-9-decanoato de etilo	0,3	0,3	0,3	6,2	3,7	2,0	13,2	9,8	9,0	25,7	23,8	25,9
benzenoacetato de etilo	1,4	1,7	1,7	3,7	2,2	4,2	0,8	0,6	0,6	1,1	0,7	1,4
dodecanoato de etilo	5,9	9,1	8,1	31,4	25,2	26,0	12,0	14,0	9,2	20,5	27,1	23,7
tetradecanoato de etilo	2,5	1,7	1,9	10,0	9,3	13,2	3,3	2,5	2,3	7,6	5,0	7,0
hexadecanoato de etilo	8,3	7,6	6,8	40,8	34,3	33,0	23,3	17,4	25,9	13,7	15,8	13,9

* $n=3$

Os ésteres etílicos dos ácidos gordos com 6, 8 e 10 átomo de carbono (C_6 , C_8 , e C_{10}) são os mais significativos, não só pelas concentrações em que se encontram, como pelos agradáveis odores a fruta (papaia, banana, morango, ananás) que transmitem aos vinhos. Conjuntamente contribuem com $74,0\pm 1,9$ % para o total da fracção livre dos ésteres etílicos dos ácidos gordos nos vinhos da casta *Boal*. Para os vinhos das restantes castas os valores são de $76,0\pm 5,2$ % para os vinhos *Malvazia*, $74,7\pm 1,4$ % para os vinhos *Sercial* e $87,1\pm 2,4$ % para os vinhos *Verdelho*.

Os vinhos da casta *Verdelho* possuem teores de octanoato e decanoato de etilo significativamente mais elevados do que os vinhos das outras castas (figura 3.44). Os vinhos *Boal* são os que apresentam as concentrações mais baixas deste grupo de compostos. As concentrações em que estes compostos se encontram nos vinhos da casta *Verdelho* ($1473,0\pm 321,7$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em octanoato de etilo e $1986,3\pm 311,8$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em decanoato de etilo), superiores aos respectivos limiares de percepção olfactiva (580

$\mu\text{g.L}^{-1}$ para o octanoato e $510 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o decanoato), determinam a sua contribuição com nuances florais e frutadas, nomeadamente a “banana”, “ananás” e “pêra”, para o aroma dos vinhos destas duas castas. O decanoato de etilo com uma concentração média de $1710,0 \pm 435,9 \mu\text{g.L}^{-1}$, também participa com notas frutadas para o aroma do vinho da casta *Malvazia*.

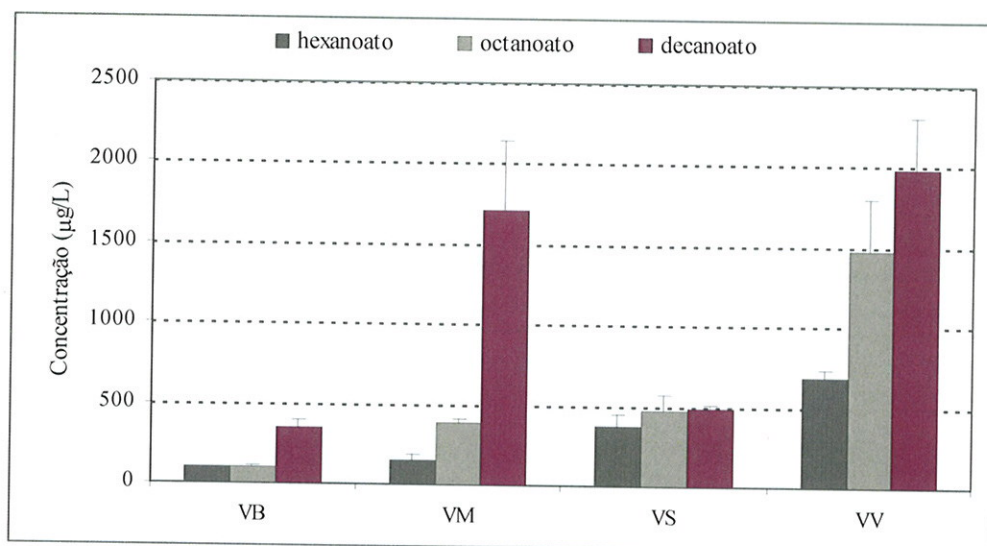


Figura 3.44 – Teores médios (média±desvio padrão) dos ésteres etílicos de ácidos gordos quantificados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

O hexanoato de etilo, por se encontrar em concentrações superiores ao seu limiar de percepção olfativo ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$; Etiévant, 1991), garantindo um índice aromático ($I = \text{concentração} / \text{limiar de percepção olfativa}$) superior à unidade, contribui com aromas frutados, essencialmente a “maçã”, em qualquer dos vinhos das castas estudadas (tabela 3.16). Analogamente ao verificado para o éster do ácido C_8 , os vinhos da casta *Verdelho* ($678,1 \pm 52,7 \mu\text{g.L}^{-1}$) são os mais ricos em hexanoato de etilo, contrariamente aos vinhos da casta *Boal* ($98,7 \pm 4,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) que apresentam os teores mais baixos.

Os vinhos das castas *Malvazia* e *Verdelho* possuem teores de decanoato de etilo significativamente mais elevados do que os determinados nos vinhos das outras castas estudadas (figura 3.44).

Relativamente ao ano de vindima, não há uma tendência notória no comportamento dos ésteres. Verificou-se um ligeiro decréscimo ($3,8 \pm 0,7$ %) da vindima de 1998 para a de 1999, seguindo-se um aumento de $5,7 \pm 1,8$ % da vindima de 1999 para a de 2000 (figura 3.42). Os vinhos das castas *Boal* e *Verdelho*, apresentam valores percentuais mais elevados na vindima de 2000, enquanto que nos vinhos da casta *Sercial* e *Malvazia* as percentagens mais elevadas verificaram-se na vindima de 1998 (figura 3.42).

3.5.4.3 Ésteres etílicos de ácidos fixos

Tendo em consideração as três vindimas efectuadas, os ésteres etílicos dos ácidos fixos totalizam, em média, $4,7\% \pm 2,9$ % da fracção livre aromática. Os vinhos das castas *Sercial* ($8,4 \pm 1,3$ %) e em menor extensão das castas *Malvazia* ($5,7 \pm 0,7$ %) e *Boal* ($3,6 \pm 0,9$ %) são os mais ricos neste tipo de compostos, contrariamente aos vinhos da casta *Verdelho*, cuja contribuição para a fracção livre aromática é de $1,0 \pm 0,04$ %.

Na tabela 4. AA (pág. 285) estão registados os teores médios dos ésteres etílicos dos ácidos fixos para os vinhos das diferentes castas estudadas.

O lactato de etilo e o succinato de dietilo são os ésteres predominantes. Conjuntamente perfazem $98,5 \pm 0,4$ % da totalidade da fracção livre deste grupo de compostos nos vinhos da casta *Boal*. Nos vinhos da casta *Malvazia* a contribuição destes dois ésteres é de $88,4 \pm 4,7$ %, nos vinhos *Sercial* de $95,8 \pm 0,3$ % e nos vinhos *Verdelho* contribuem com $84,9 \pm 1,5$ %, para a fracção livre aromática dos ésteres etílicos dos ácidos fixos.

Relativamente ao ano de vindima, verificou-se que com excepção dos vinhos da casta *Boal*, para os quais a percentagem relativa de ésteres de ácidos fixos aumenta de $37,8$ % da vindima de 1999 para a de 2000, nos vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, a percentagem deste grupo de compostos mantém-se praticamente constante para as três vindimas estudadas (figura 3.42). A vindima de 1998 foi a que apresentou, em média, as percentagens mais elevadas em ésteres etílicos de ácidos fixos ($5,1 \pm 1,0$ %).

Dos restantes grupos, os compostos carbonilados contribuem, com uma percentagem média, de $3,1 \pm 0,8$ % para a totalidade da fracção livre aromática dos vinhos da casta *Boal*. Das castas estudadas, foram os vinhos da casta *Verdelho* que apresentaram os teores mais baixos dos compostos deste grupo, apenas $0,4 \pm 0,01$ % do total da fracção livre. Nos vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial*, a contribuição deste grupo de compostos para a fracção livre total de cada casta é de $1,3 \pm 0,3$ % e $0,9 \pm 0,1$ %, respectivamente. O acetaldeído e o benzaldeído são os que mais contribuem para os valores percentuais referidos.

Os teores de acetaldeído não diferem significativamente entre os vinhos das diferentes castas (de $15,7 \pm 3,9$ mg.L⁻¹ nos vinhos da casta *Verdelho* a $23,3 \pm 3,5$ mg.L⁻¹ nos vinhos da casta *Boal*).

Relativamente ao benzaldeído, os vinhos da casta *Boal* ($167,0 \pm 15,3$ µg.L⁻¹) apresentam teores bastante superiores aos das outras castas, contrariamente aos vinhos da casta *Verdelho* para os quais foram determinados os teores mais baixos ($17,1 \pm 1,3$ µg.L⁻¹).

Na tabela 3.18, estão registados os valores médios destes dois compostos carbonilados determinados nas vindimas de 1998, 1999 e 2000.

Tabela 3.18 Concentração média (n=3) de acetaldeído e benzaldeído nos vinhos das diferentes castas para as três vindimas efectuadas.

Compostos carbonilados	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
acetaldeído (mg.L ⁻¹)	27,2	22,1	20,6	12,6	24,5	18,4	15,3	26,2	18,1	11,9	19,7	15,6
benzaldeído (µg.L ⁻¹)	171,7	149,9	179,4	80,4	71,9	70,2	40,1	27,9	42,68	17,4	18,2	15,7

Verificou-se que nos vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho*, a percentagem relativa deste grupo de compostos mantém-se praticamente constante para as três vindimas estudadas (figura 3.45), o mesmo sucedendo com os vinhos das castas *Boal* e *Malvazia* nos anos de 1998 e 1999. Para estas duas castas verificaram-se, no entanto, variações acentuadas da vindima de 1999 para a de 2000, com um aumento de $68,4 \pm 8,1$ % na fracção livre aromática dos vinhos da casta *Malvazia* e de $62,3 \pm 6,9$ % nos vinhos da casta *Boal*.

A figura 3.45 mostra a variação da percentagem relativa dos compostos carbonilados (aldeídos e cetonas – Ald/Cet) nas diferentes castas estudadas, para cada vindima efectuada.

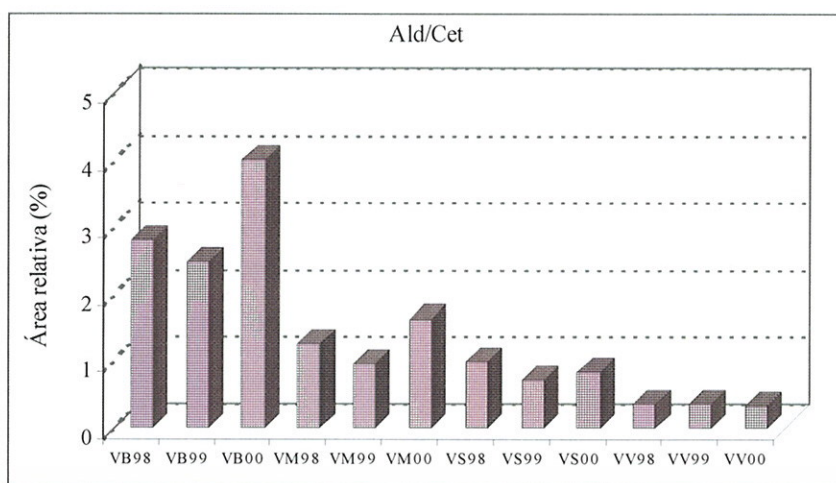


Figura 3.45 – Variação da percentagem relativa dos compostos carbonilados (Ald/Cet) nas diferentes castas de vinho Madeira, para cada vindima estudada.

Os furanos ($0,2 \pm 0,1$ %) e os fenóis voláteis ($0,09 \pm 0,06$ %) são os grupos de compostos aromáticos que menos contribuem para a fracção livre total dos vinhos Madeira das diferentes castas.

Contrariamente aos vinhos da casta *Sercial*, para os quais a contribuição dos compostos furânicos para a fracção livre total é de apenas $0,1 \pm 0,01$ %, os vinhos da casta *Verdelho* apresentam a contribuição mais elevada deste grupo de compostos, $0,3 \pm 0,05$ %. Nos vinhos das castas *Boal* e *Malvazia* a contribuição dos compostos furânicos para a totalidade da fracção livre é similar, $0,2 \pm 0,04$ % para os primeiros e $0,2 \pm 0,03$ %, para os segundos.

Para a baixa percentagem atribuída aos furanos contribuem, quase exclusivamente, o furfural e o 5-(hidroximetil)furfural, que conjuntamente perfazem nos vinhos da casta *Sercial* $92,0 \pm 1,2$ % da fracção livre total dos compostos furânicos. Nos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*, a contribuição é de $73,3 \pm 2,9$ %, $90,4 \pm 2,6$ % e $87,0 \pm 1,3$ %, respectivamente.

Nos vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, observou-se uma diminuição gradual, mas pouco significativa, dos teores dos compostos furânicos

(figura 3.46) ao longo das três vindimas estudadas. Este facto não se verifica nos vinhos da casta *Boal* para os quais ocorreu um aumento acentuado (65,2 %) da vindima de 1999 para a de 2000.

A variação da percentagem relativa dos compostos furânicos e dos fenóis voláteis, nos vinhos das diferentes castas estudadas para cada vindima efectuada, está representada na figura 3.46.

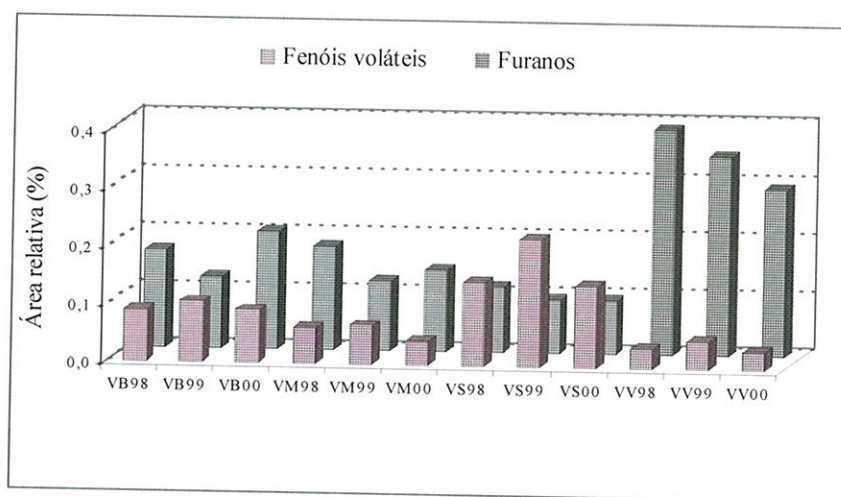


Figura 3.46 – Variação da percentagem relativa dos compostos furânicos e dos fenóis voláteis nas diferentes castas, para cada vindima.

Dos vinhos estudados, são nos da casta *Sercial* que os fenóis voláteis mais contribuem para a fracção livre aromática, $0,2 \pm 0,05$ %. Nos vinhos das restantes castas, a contribuição deste grupo de compostos para a totalidade da fracção aromática é inferior, $0,1 \pm 0,009$ % para os vinhos da casta *Boal*, $0,06 \pm 0,01$ % para os vinhos da casta *Malvazia* e $0,04 \pm 0,009$ % para os vinhos da casta *Verdelho*.

Deste grupo de compostos, são de realçar as áreas relativas, significativamente mais elevadas, o eugenol ($0,2 \pm 0,04$) nos vinhos da casta *Boal* e o 4-etilguaiacol ($0,7 \pm 0,1$) nos vinhos da casta *Sercial*, comparativamente aos vinhos das outras castas.

Nos vinhos da casta *Malvazia*, verificou-se um decréscimo acentuado, de $35,9 \pm 7,3$ %, na percentagem relativa dos fenóis voláteis da vindima de 1999 para a de 2000. Para os vinhos das outras variedades, a percentagem relativa deste grupo de compostos mantém-se praticamente constante nas três vindimas (figura 3.46).

Verificou-se (figura 3.47) que nas duas primeiras vindimas efectuadas, 1998 e 1999, as áreas totais relativas dos compostos da fracção livre aromática permanecem praticamente constantes em qualquer dos vinhos estudados. Na vindima de 2000, constata-se um decréscimo do total da fracção livre aromática nos vinhos das castas *Boal* (25,7 %) e *Malvazia* (22,5 %) relativamente à vindima de 1999, e um aumento nos vinhos da casta *Sercial* (29,8 %). As razões deste comportamento estão relacionadas, principalmente, com as variações verificadas nos álcoois superiores, ácido gordos voláteis e ésteres etílicos dos ácidos gordos.

Na figura 3.47, representa-se o total da fracção livre aromática das diferentes castas, para cada vindima efectuada.

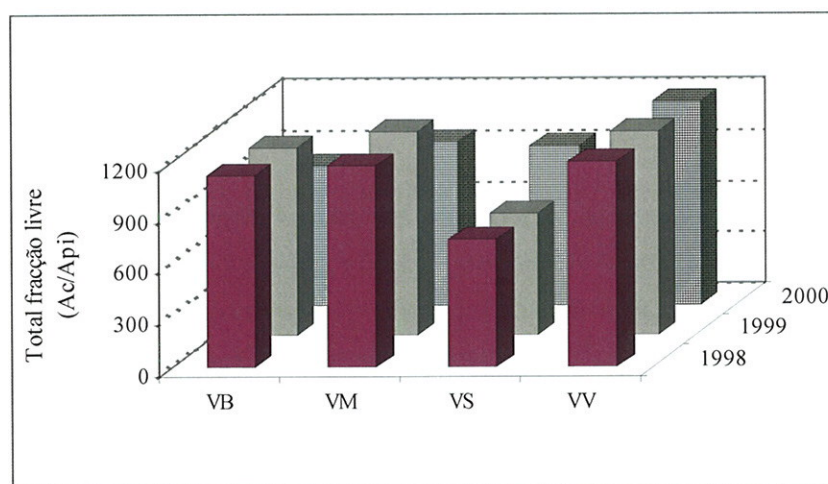


Figura 3.47 – Variação da fracção livre aromática total nas diferentes castas estudadas, para cada ano de vindima.

3.6 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO AROMÁTICA DE ALGUNS COMPOSTOS NOS VINHOS DAS CASTAS ESTUDADAS

A importância de um determinado composto químico no aroma do vinho depende não só da concentração em que este se encontra, mas também do limiar de percepção olfactiva do referido composto. Para poder ter em conta os dois factores, definiu-se o denominado *coeficiente aromático* ou *índice aromático* (I), que

corresponde ao coeficiente entre a concentração de uma substância e o seu LPO ($I = \text{concentração}/\text{limiar de percepção}$). Este parâmetro não tem unidades pelo que, arbitrariamente, se expressa como número de unidades olfactivas (OAV)¹, e permite identificar os compostos que intervêm, efectivamente, no aroma final dos vinhos.

Genericamente, consideram-se como participantes no aroma dos vinhos os compostos que apresentem um *índice aromático*, *I*, superior à unidade. No entanto, compostos com $I > 0,5$ OAV, devido essencialmente a efeitos sinérgicos, poderão contribuir para a complexidade aromática do vinho.

Na tabela 3.19 descrevem-se alguns dos compostos, que por apresentarem valores de *índice aromático* superior à unidade, contribuem para o aroma das diferentes variedades de vinho Madeira estudadas. Saliente-se, no entanto, que a determinação do *índice aromático* foi efectuada apenas com os compostos que foram quantificados existindo, muito provavelmente, outros compostos que participam no aroma dos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*.

Tabela 3.19 *Limiares olfactivos, descritores aromáticos (Ferreira et al., 1998; Ferreira et al., 1993) e índices aromáticos dos compostos quantificados que contribuem para o aroma dos vinhos das castas Boal (VB), Malvazia (VM), Sercial (VS) e Verdelho (VV).*

Compostos	LPO ^a vinho (µg.L ⁻¹)	Descritores aromáticos	I (concentração/limiar de percepção)			
			VB	VM	VS	VV
acetato de etilo	12264 ^b	ananás, balsâmico, solvente	1,1	1,0	1,3	1,1
acetato de isoamilo	50	banana, maçã, solvente	0,3	2,2	3,5	4,3
hexanoato de etilo	80	banana, maçã verde, anis	1,2	1,9	4,6	8,5
octanoato de etilo	580	maçã, pêra, floral, adocicado	0,2	0,7	0,8	2,5
β-damascenona	0,05	floral, fruto exótico	1,3	2,5	1,1	1,3
decanoato de etilo	510	ácidos gordos, frutado	0,7	3,4	0,9	3,9
2-feniletanol	1400	rosas, mel	2,5	1,2	0,7	0,7

a: Guth, 1997; b: Ferreira, et. al., 2002.

Os vinhos da casta *Boal* são caracterizados por apresentarem, em média, percentagens de álcoois superiores, compostos carbonilados e fenóis voláteis, superiores às determinadas para os vinhos das outras castas. Os vinhos desta casta apresentam os teores mais baixos em acetatos de álcoois superiores e os mais elevados em benzaldeído e álcool benzílico. Dos compostos quantificados, participam no aroma

¹ OAV: Do inglês Odour Activity Value

desta casta o acetato de etilo, o hexanoato de etilo, a β -damascenona e o 2-feniletanol, conferindo aos vinhos *Boal* aromas “frutados” e “florais”, essencialmente.

Os vinhos da casta *Malvazia* são os mais ricos em compostos terpênicos cujos teores são, no entanto, inferiores ao limiar de percepção olfactiva, pelo que a sua contribuição para o perfil aromático dos vinhos das castas estudadas é pouco significativa. O acetato de etilo com notas “frutadas” e a “solvente”, os ésteres etílicos de ácidos gordos: hexanoato de etilo e decanoato de etilo com odores a fruta, essencialmente a “banana”, “ananás” e a “pêra”, o 2-feniletanol com aroma a “rosas” e a “mel”, e a β -damascenona com notas a “frutos exóticos”, são os compostos aromáticos da fracção livre volátil que mais contribuem para o perfil aromático dos vinhos da casta *Malvazia*.

A figura 3.48 mostra a distribuição dos compostos que mais contribuem para o perfil aromático dos diferentes vinhos estudados.

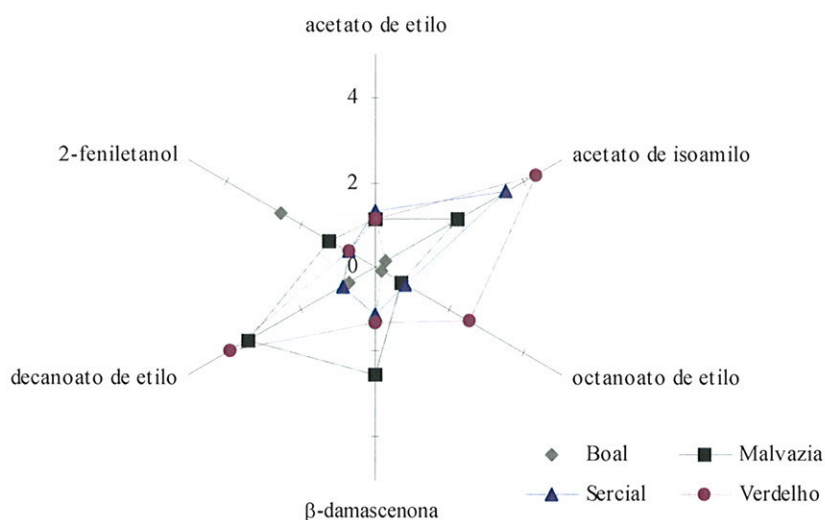


Figura 3.48 – Distribuição de alguns dos compostos que contribuem para o perfil aromático dos vinhos Madeira.

O acetato de etilo, o acetato de isoamilo, o hexanoato de etilo e a β -damascenona contribuem, essencialmente com nuances a “frutos” para o aroma dos vinhos da casta *Sercial*. Das castas estudadas, são os vinhos desta casta que apresentam os teores mais baixos de 2-feniletanol.

Para as notas frutadas e florais apresentadas pelos vinhos da casta *Verdelho*, contribuem os acetatos de etilo e isoamilo, os ésteres etílicos dos ácidos gordos em C₆, C₈ e C₁₀ e a β-damascenona.

As estruturas químicas dos sete compostos que participam, efectivamente, no aroma dos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas, determinados através dos *índices aromáticos*, estão representadas na figura 3.49.

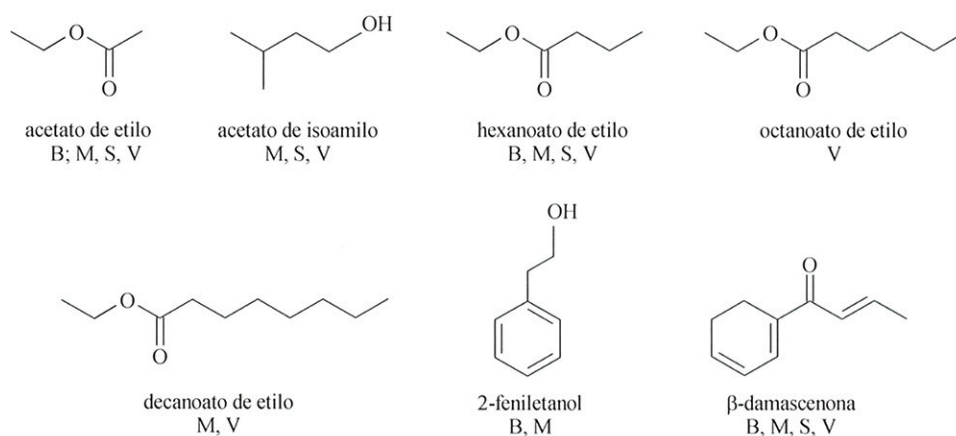


Figura 3.49 – Estruturas químicas dos compostos odorificamente activos dos vinhos das castas *Boal* (B), *Malvazia* (M), *Sercial* (S) e *Verdelho* (V).

3.7 COMPARAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS LIVRES NAS UVAS, MOSTOS E VINHOS

A figura 3.50 evidencia, a evolução dos diferentes grupos de compostos aromáticos nas uvas, mostos e vinhos da casta *Sercial*. Para as castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho* o padrão de distribuição dos diferentes grupos é similar.

Nas uvas das castas estudadas, não foram identificados acetatos de álcoois superiores, ésteres de ácidos gordos e de ácidos fixos, corroborando o descrito na Introdução de que estes compostos terão a sua génese nas etapas subseqüentes da elaboração do vinho (fermentação e conservação). Constata-se que a percentagem de compostos terpénicos nas uvas é elevada devido à contribuição de vários monoterpenos, principalmente, o (-)-limoneno, o copaeno, o α-cubebeno e o α-farneseno. Os teores de monoterpenóis são relativamente baixos, sendo os mais

abundantes são o linalol e o geraniol, contrariamente ao α -terpineol e nerol existentes em quantidades vestigiais.

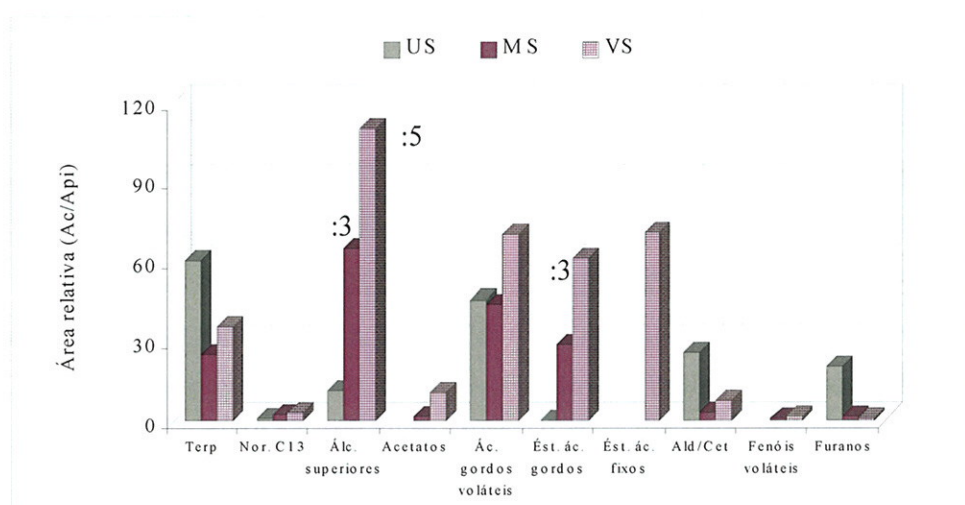


Figura 3.50 - Evolução dos diferentes compostos aromáticos da fração livre das uvas, (excepto o (-)-limoneno), dos mostos (excepto o hexan-1-ol) e dos vinhos (exceptuando o 2-metil-1-butanol, o 2-feniletanol e o decanoato de etilo) ao longo do processo de elaboração do vinho, para a casta Sercial (US - Uvas Sercial; MS - Mosto Sercial; VS - Vinho Sercial).

É significativa a evolução dos teores dos álcoois superiores das uvas para os mostos e principalmente destes para os vinhos ($289,5 \pm 16,3$ %), confirmando a sua formação na fase pré-fermentativa e, essencialmente, na fase fermentativa.

É igualmente significativa a evolução dos ésteres etílicos dos ácidos gordos dos mostos para os vinhos com 8 meses de conservação, comprovando que a sua génese ocorre fundamentalmente nesta fase, de acordo com o esperado.

A detecção e identificação dos ésteres etílicos dos ácidos fixos apenas nos vinhos, é indicador da sua origem no processo fermentativo e, principalmente, durante a conservação do vinho.

Os teores elevados de (*E*)-hex-2-enal e hexanal, justificam a elevada percentagem dos compostos carbonilados nas uvas relativamente aos mostos e aos vinhos.

3.8 ESTUDO DA FRACÇÃO LIVRE NO DECURSO DO ENVELHECIMENTO POR HS-SPME

O envelhecimento é uma das etapas mais importantes na elaboração de um vinho, durante a qual ocorrem profundas alterações na sua composição volátil e aromática. Às reacções de oxidação associam-se outras reacções químicas, nomeadamente: esterificação/hidrólise, acetaliação, degradação de açúcares, entre outras, que alteram o perfil aromático dos vinhos conferindo-lhes as qualidades organolépticas características do envelhecimento. Diminuem progressivamente os aromas “florais” e a “frutos” característicos dos vinhos jovens, surgindo aromas mais complexos, especialmente a “noz”, “coco” e “especiarias”.

Os vinhos Madeira atingem a sua tipicidade aromática após vários anos de envelhecimento. A duração e as condições em que decorre, desempenham um papel determinante na qualidade do produto final. Este processo tem uma incidência ainda maior no caso dos vinhos Madeira, tendo em conta a sua longevidade. De acordo com alguns investigadores, as principais modificações do aroma ocorrem nos primeiros seis meses, embora continuadas durante todo o envelhecimento.

Um vez estudada a fracção volátil constituinte das uvas, dos mostos e dos vinhos monovarietais das diferentes castas, foi nosso propósito, por um lado, avaliar o comportamento de alguns compostos como os ésteres, ácidos gordos e álcoois superiores no decurso do processo de envelhecimento dos vinhos, e por outro, detectar eventuais compostos que se formam durante o envelhecimento e que poderão participar no “*bouquet*” dos vinhos Madeira.

Com este intuito, analisaram-se 32 amostras de vinhos Madeira das quatro castas estudadas: 12 amostras de vinhos com 8 meses de conservação (ano de 2000; 3 de cada uma das castas), 12 amostras com 11 anos de envelhecimento (ano de 1990; 3 de cada uma das castas) e 8 amostras com 25 anos de envelhecimento (ano de 1976; 2 de cada casta), armazenados em cascos de madeira de carvalho. Os compostos voláteis destes vinhos foram extraídos por microextração em fase sólida com espaço de cabeça, HS-SPME, de acordo com as condições do quadro I.

A figura 3.51 mostra a justaposição dos cromatogramas de duas amostras de vinhos *Malvazia* com 8 meses e 25 anos de envelhecimento, analisadas de acordo com as condições do quadro I.

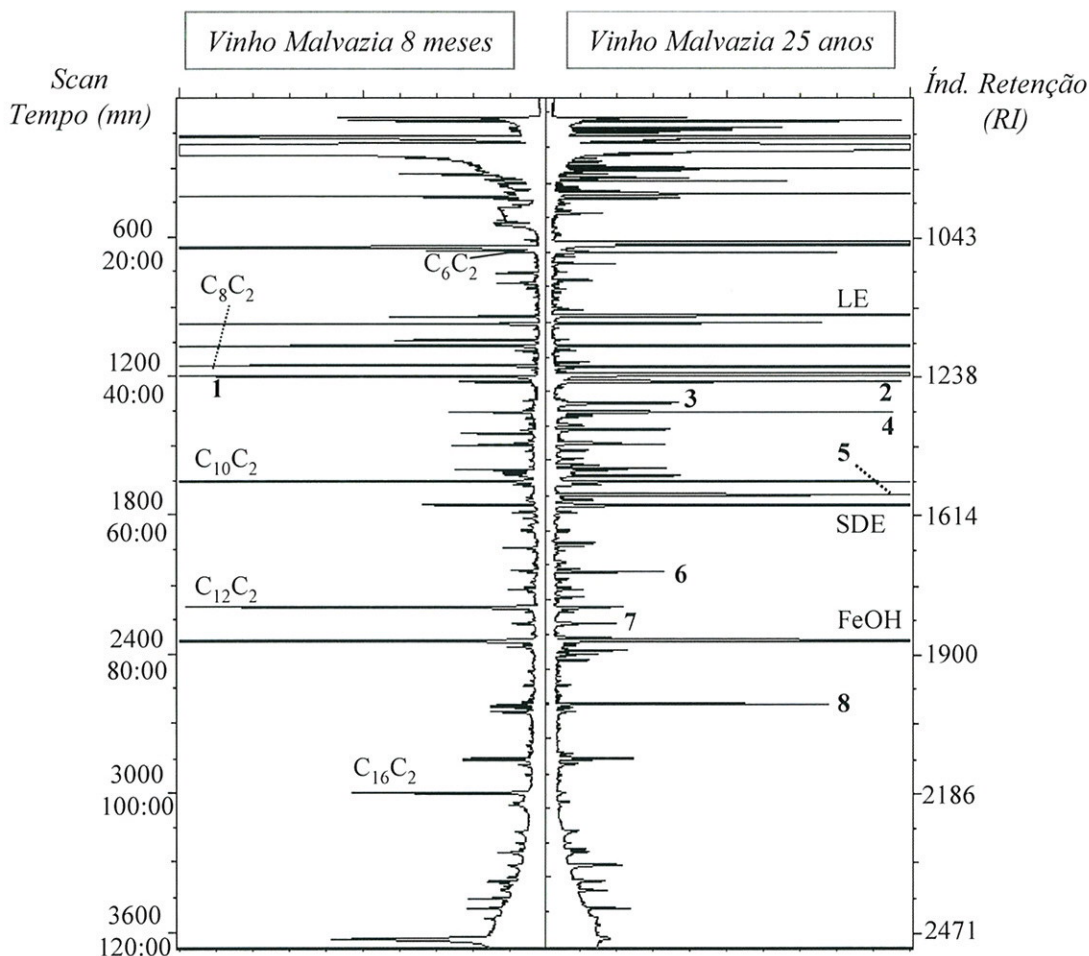


Figura 3.51 –Cromatogramas GC-MS resultantes da extração por HS-SPME de duas amostras de vinhos da casta *Malvazia*, com 8 meses e 25 anos, respectivamente.

Legenda: 1- ácido acético; 2- furfural; 3- 1,1-dietoxietano; 4- benzaldeído; 5- benzoato de etilo; 6- benzenoacetato de etilo; 7- álcool benzílico; 8- 3-hidroxihexanoato de etilo; LE- lactato de etilo; SDE- succinato de dietilo; FeOH- 2-feniletanol; C_6C_2 - hexanoato de etilo; C_8C_2 - octanoato de etilo; $C_{10}C_2$ - decanoato de etilo; $C_{12}C_2$ - dodecanoato de etilo; $C_{16}C_2$ - hexanoato de etilo).

É notória a evolução de alguns compostos ao longo do envelhecimento dos vinhos, com especial realce para os ésteres etílicos de ácidos gordos, que apresentam uma nítida diminuição da altura do pico, contrariamente ao aumento significativo dos

ésteres etílicos dos ácidos fixos (lactato de etilo e succinato de dietilo), do 3-hidroxihexanoato de etilo e do benzoato de etilo.

Verificou-se um aumento dos teores dos isómeros do óxido de linalol de $35,9 \pm 4,7$ % nos primeiros 11 anos. Este aumento, embora menos acentuado ($9,6 \pm 2,3$ %) continua até aos 25 anos de envelhecimento. Durante o intervalo de tempo considerado, os teores do isómero *trans*- são superiores aos do isómero *cis*-.

Os norisoprenóides em C_{13} (Nor. C13), que se encontram sob a forma glicosilada nas uvas, apresentam um aumento significativo ($55,3 \pm 7,4$ %) nos primeiros 11 anos (de 2000 para 1990), seguida de uma diminuição acentuada ($26,4 \pm 6,1$ %), nos 14 anos subsequentes (1990 a 1976). Este facto deve-se, essencialmente, às variações dos teores do TDN e em menor extensão dos isómeros do vitispirano.

Os teores de vitispirano I são superiores ao do vitispirano II em qualquer dos vinhos das castas estudadas. Apresentam uma evolução linear com o tempo de armazenamento.

A figura 3.52 mostra a relação de proporcionalidade existente entre estes dois isómeros.

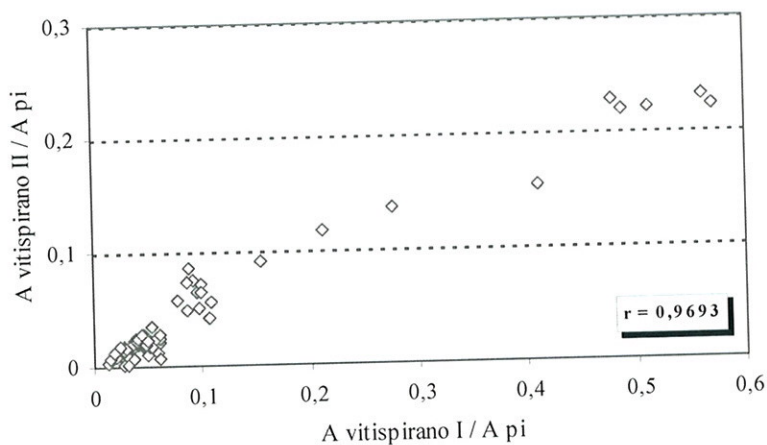


Figura 3.52 – Correlação entre os teores de vitispirano I e vitispirano II para os vinhos Madeira estudados.

A β -damascenona apresenta uma diminuição acentuada com o envelhecimento. Este composto, encontrando-se sob a forma glicosilada nas uvas, é susceptível de ser hidrolisado durante os processos de fermentação dos mostos e nos primeiros meses de

conservação dos vinhos (Oliveira, 2001). Não foi detectado nos vinhos com 25 anos de envelhecimento.

Em termos genéricos e considerando as quatro castas estudadas, os teores dos álcoois superiores aumentam significativamente, em média, $24,7 \pm 6,3$ %, durante os primeiros 11 anos de envelhecimento. Este aumento é devido, essencialmente, ao aumento dos teores do 2- e 3-metilbutan-1-ol e do 2-feniletanol. A partir deste período a evolução é menos pronunciada, apenas $3,1 \pm 1,7$ %, nos 14 anos seguintes. A evolução dos álcoois em C_6 é pouco significativa. É de realçar, no entanto, que o quociente entre os isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol, que nos vinhos novos pode contribuir para a diferenciação das diferentes variedades de vinho Madeira estudadas (tabela 3.15), tende para um valor aproximadamente constante ($2,6 \pm 0,2$) ao fim de 25 anos de envelhecimento.

A figura 3.53 ilustra o comportamento de álcoois superiores ao longo do envelhecimento para os vinhos da casta *Boal* com 8 meses, 11 e 25 anos, respectivamente.

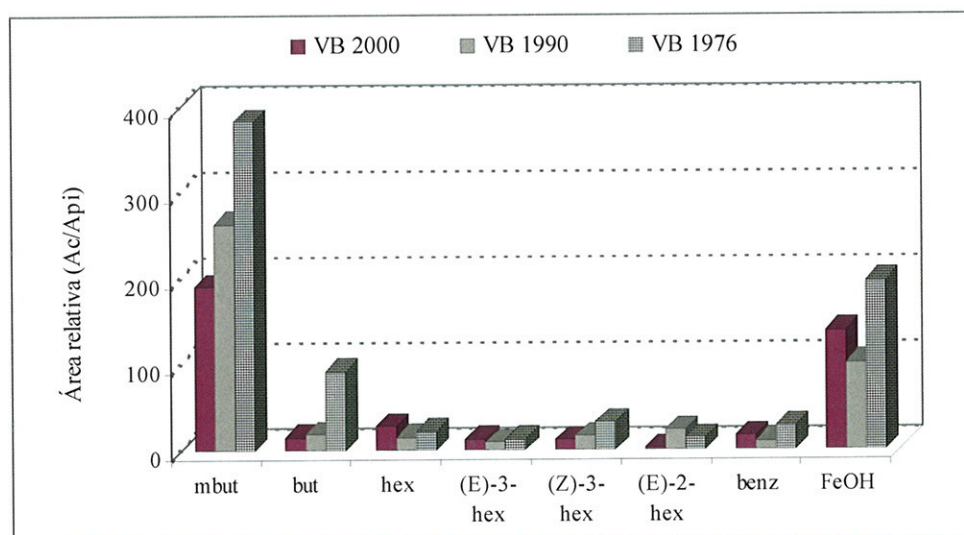


Figura 3.53 – Evolução de álcoois superiores ao longo do envelhecimento para vinhos da casta *Boal* com 8 meses (2000), 11 (1990) e 25 anos (1976) de envelhecimento.

Legenda: mbut– 2+3-metilbutan-1-ol; but– butan-1-ol; hex– hexan-1-ol; (E)-3-hex- (E)-hex-3-en-1-ol; (Z)-3-hex- (Z)-hex-3-en-1-ol; (E)-2-hex- (E)-hex-2-en-1-ol; benz– álcool benzílico; FeOH– 2-feniletanol.

Para os vinhos da casta *Boal* e durante os primeiros onze anos de conservação, a evolução dos álcoois superiores é pequena ($2,2 \pm 0,6$ %) contrariamente aos aumentos significativos de $44,5 \pm 7,3$ %, $24,4 \pm 8,2$ % e $19,6 \pm 4,9$ %, verificados nos vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, respectivamente. Nos 14 anos seguintes os teores dos álcoois superiores continuam a aumentar devido, essencialmente, às variações do 2- e 3-metilbutan-1-ol.

Os acetatos dos álcoois superiores sofrem um ligeiro aumento ($3,0 \pm 1,2$ %) nos primeiros onze anos de envelhecimento. Nos 14 anos subsequentes verificou-se um aumento significativo nos teores dos compostos deste grupo ($32,8 \pm 8,1$ %) devido, principalmente, ao aumento dos teores do acetato de isoamilo.

Durante o intervalo de tempo estudado, os ácidos gordos voláteis e os ésteres etílicos dos ácidos gordos são relativamente estáveis. De 2000 para 1990 a percentagem dos ácidos gordos aumenta ligeiramente ($5,9 \pm 1,8$ %) mantendo-se praticamente constante nos 14 anos seguintes. Os ésteres etílicos dos ácidos fixos serão objecto de um estudo mais aprofundado. O gráfico da figura 3.54 mostra a evolução de alguns ácidos gordos ao longo do tempo de conservação.

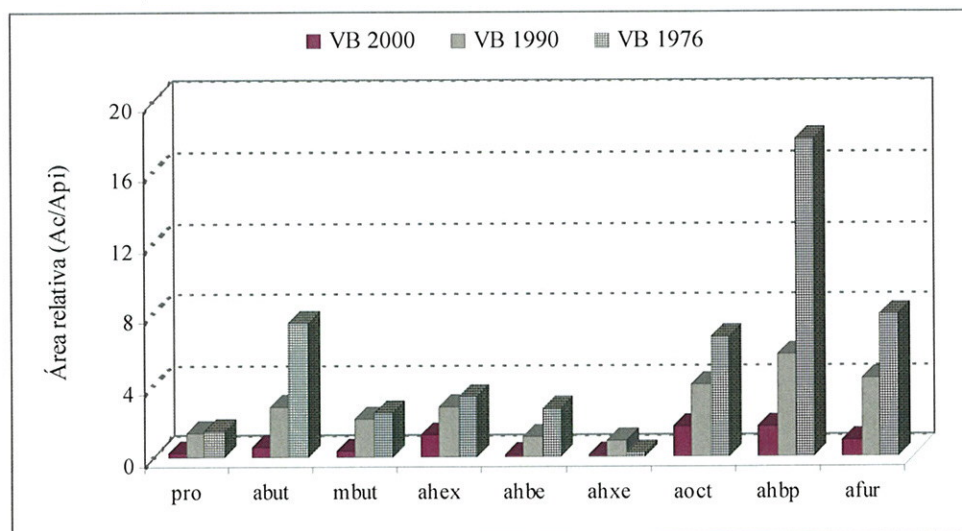


Figura 3.54 – Evolução dos teores de ácidos gordos ao longo do envelhecimento para os vinhos da casta *Boal* com 8 meses (2000), 11 (1990) e 25 anos (1976).

Legenda: pro– ácido propanóico; abut– ácido butanóico; mbut– ácido 3-metilbutanóico; ahex– ácido hexanóico; ahbe– ácido 2-hidroxibenzenoetanóico; ahxe– ácido (E)-hex-2-enóico; aoct– ácido octanóico; ahbp– ácido 2-hidroxibenzenopropanóico; afur– ácido 2-furanocarboxílico.

Na figura 3.55 mostra-se a evolução da fracção livre aromática total, expressa em termos de áreas relativas, nas diferentes variedades dos vinhos Madeira, ao longo do envelhecimento. São apresentados os valores encontrados para vinhos com 8 meses (2000), com 11 anos (1990) e 25 anos (1976) de envelhecimento.

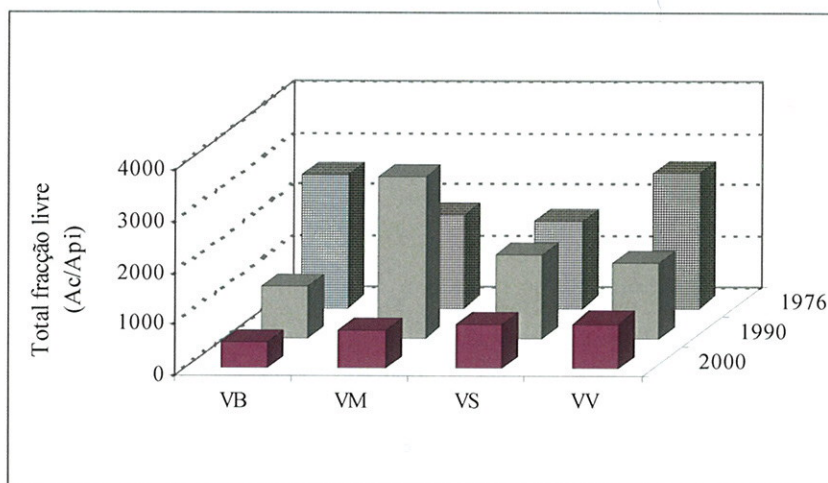


Figura 3.55 – Evolução da fracção livre aromática total dos vinhos das diferentes castas estudadas ao longo do envelhecimento (extração: HS-SPME, fibra PA-85 μ m).

Em termos de áreas totais relativas dos compostos da fracção livre, verificou-se para qualquer das castas um aumento significativo durante o intervalo de tempo considerado. Nos vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* o aumento é mais acentuado nos últimos 14 anos estudados, $160,7 \pm 14,6$ % e $78,4 \pm 11,2$ %, respectivamente.

Nos vinhos da casta *Sercial*, as variações das áreas relativas foram mais evidentes nos primeiros 11 anos de envelhecimento aumentando $94,9 \pm 12,3$ %, para nos 14 anos subsequentes manterem-se praticamente constantes (aumento de $4,0 \pm 0,9$ %).

O comportamento irregular verificado nos vinhos da casta *Malvazia*, aumento de $339,5 \pm 19,1$ % nos primeiros 11 anos e decréscimo de $42,0 \pm 9,4$ % nos últimos 14 anos do estudo, é devido principalmente, às variações nas áreas relativas do 2- e 3-metilbutan-1-ol, de $1134,3 \pm 124,6$ em 2000 para $3155,5 \pm 234,9$ em 1990 e $2741,4 \pm 212,6$ em 1976.

3.9 ESTUDO DA FRACÇÃO LIVRE NO DECURSO DO ENVELHECIMENTO POR EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Dos vários grupos de compostos estudados, alguns justificam um estudo mais aprofundado, caso dos ésteres, compostos carbonilados e lactonas. Para alguns deles, especialmente para os ésteres de ácidos fixos, acetais, lactonas e aldeídos furânicos e pirânicos, a eficiência da fibra é reduzida, pelo que optámos por outro método de extracção.

Para tal foram efectuadas análises em 86 amostras de vinhos (tabela 2.1; *pág. 90*) das diferentes castas, conservados em cascos de madeira, na ausência de oxigénio, de idades muito diferenciadas (de 8 meses a 25 anos), utilizando a cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS) em modo de impacto electrónico.

Os extractos dos vinhos foram obtidos por extracção líquido-líquido usando como solvente extractor o diclorometano (DCM) de acordo com o método descrito em 2.6.3.1 (*pág. 98*). O estudo foi efectuado considerando as áreas normalizadas relativamente ao padrão interno (octan-3-ol).

A figura 3.56 mostra a justaposição dos cromatogramas de dois vinhos da mesma casta com 8 meses e 25 anos de envelhecimento, resultantes da extracção líquido-líquido com DCM de acordo com o processo descrito, obtidos por GC-MS utilizando como coluna capilar a *Stabilwax*.

Na tabela 5. AA (*pág. 286*) encontram-se descritos alguns compostos voláteis identificados nos vinhos das diferentes castas estudadas, resultantes da extracção líquido-líquido com diclorometano.

É notória a evolução de alguns compostos ao longo do envelhecimento dos vinhos, com especial realce para os ésteres etílicos de ácidos gordos, que apresentam uma nítida diminuição da altura do pico, contrariamente ao aumento significativo dos ésteres etílicos dos ácidos fixos (lactato de etilo e succinato de dietilo), do 3-hidroxihexanoato de etilo e do benzoato de etilo.

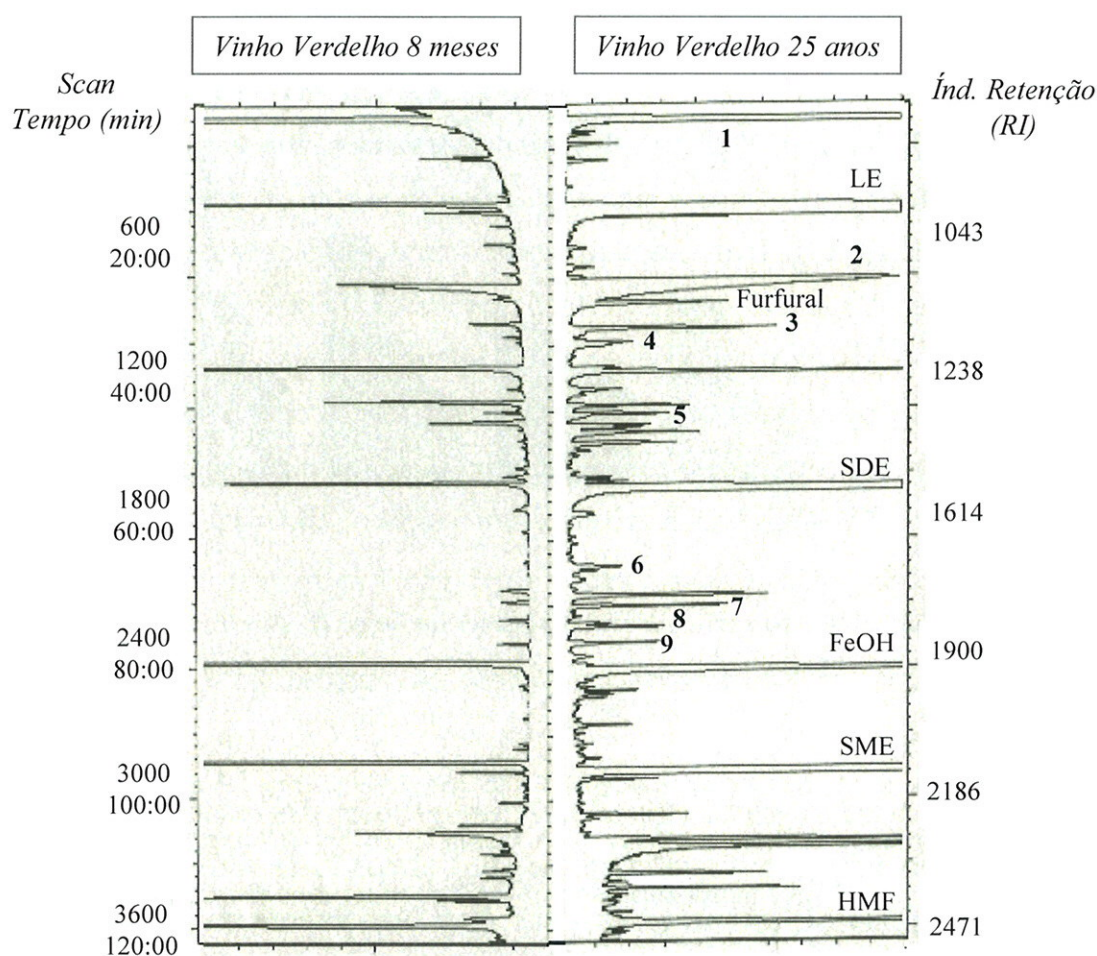


Figura 3.56 –Cromatogramas GC-MS resultantes da extração por DCM de duas amostras de vinhos da casta Verdelho, com 8 meses e 25 anos, respectivamente.

Legenda: 1- 2-metilbutan-1-ol; 2- ácido acético; 3- cis-dioxano; 4- benzaldeído; 5- cis-dioxolano; 6- trans-dioxolano; 7- trans-dioxano; 8- N-(3-metilbutil)acetamida; 9- álcool benzílico; LE- lactato de etilo; SDE- succinato de dietilo; FeOH- 2-feniletanol; SME- succinato de etilo; HMF- 5-(hidroximetil)furfural.

De um modo geral, durante o envelhecimento dos vinhos os diferentes grupos de compostos apresentaram um comportamento coerente com o que foi referido na Introdução (Capítulo 1). No que concerne ao comportamento dos álcoois superiores, nas diferentes castas de vinho Madeira ao longo do envelhecimento, verificou-se um aumento dos teores dos compostos deste grupo para qualquer das castas estudadas.

O gráfico da figura 3.57 mostra a evolução dos teores dos álcoois superiores para os vinhos das diferentes castas estudadas ao longo do envelhecimento.

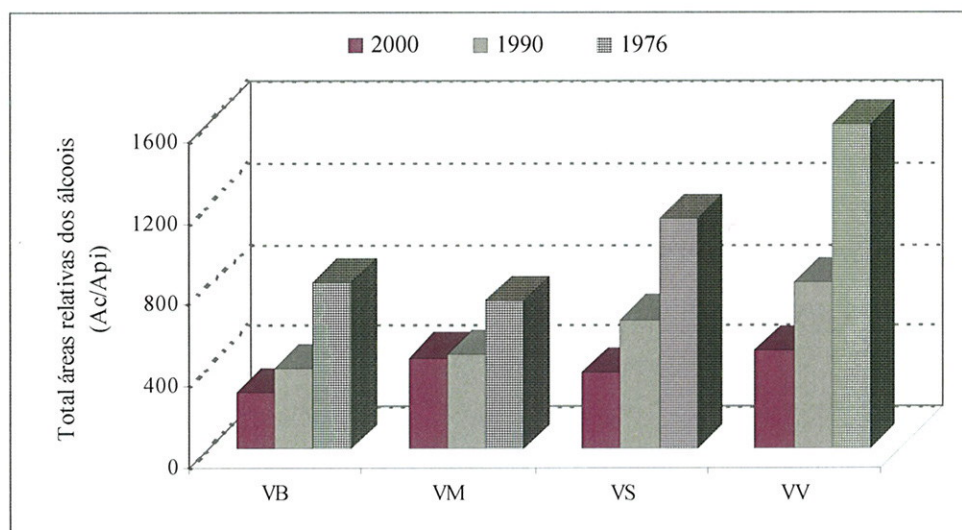


Figura 3.57 – Evolução dos teores de álcoois superiores ao longo do envelhecimento dos vinhos Madeira (extração líquido-líquido com diclorometano).

Como se pode constatar, (figura 3.57) em qualquer das castas o aumento dos teores dos álcoois superiores é mais acentuado dos 11 aos 25 anos de envelhecimento. Durante este período são os vinhos da casta *Boal* que apresentam o aumento mais significativo ($107,2 \pm 6,2$ %), contrariamente aos vinhos da casta *Malvazia* cujo aumento foi de $56,0 \pm 3,9$ %. Para os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* o aumento verificado foi de $77,9 \pm 4,2$ % e de $94,1 \pm 5,8$ %, respectivamente. Dos 8 meses aos 11 anos de envelhecimento, a variação dos teores de álcoois superiores nos vinhos da casta *Malvazia* é pouco significativa, apenas $4,2 \pm 0,67$ %, inversamente ao verificado para os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* para os quais foi determinado um incremento de 70,5 % e de 69,7 %, respectivamente. Durante este período, o aumento dos teores dos álcoois superiores nos vinhos da casta *Boal* foi de $42,1 \pm 8,1$ %.

Estas alterações devem-se, essencialmente, às variações observadas nos teores dos álcoois isoamílicos e 2-feniletanol.

3.9.1 Ésteres

No decurso da conservação do vinho a composição em ésteres é alterada devido, essencialmente, às reacções de esterificação/hidrólise. Estas são consideradas por

Schreier *et al.*, (1976) e Shinohara *et al.*, (1979) como uma das principais reacções que ocorrem ao longo do envelhecimento do vinho.

A evolução dos teores dos ésteres é determinada pelo equilíbrio da reacção de esterificação entre o ácido e o álcool, pelo que a concentração dos ésteres varia em função da concentração de ácido correspondente. Ao longo do tempo a velocidade destas reacções diminui, estando dependente de alguns factores como o pH, a natureza e concentração dos ácidos e a temperatura de conservação. Além disso, o elevado teor de etanol presente nos vinhos Madeira favorece este tipo de reacções.

Relativamente aos vinhos velhos, são os ésteres etílicos dos ácidos fixos como o lactato de etilo, que mais poderão contribuir para o seu “*bouquet*”.

3.9.1.1 Acetatos de álcoois superiores

Entre os ésteres, os acetatos de álcoois superiores são os mais sensíveis ao pH e à temperatura (Marais, 1978). A tabela 3.20 mostra a evolução média dos três acetatos de álcoois superiores, ao longo da conservação dos vinhos Madeira.

Tabela 3.20. Valores médios* das áreas relativas (Ac/A_{pi}) obtidos para os três acetatos de álcoois superiores nos vinhos estudados.

Acetatos de álcoois superiores	VB			VM			VS			VV		
	2000	1990	1976	2000	1990	1976	2000	1990	1976	2000	1990	1976
acetato de isoamilo	0,30	0,5	1,3	0,8	0,9	2,4	1,8	2,6	2,5	1,4	2,1	3,7
acetato de hexilo	0,07	0,1	0,2	0,1	0,4	0,5	0,06	0,1	0,3	0,04	0,09	0,2
acetato de 2-feniletilo	0,01	0,27	0,78	0,03	0,2	0,4	0,2	0,2	1,5	0,3	0,5	0,8

*n=3

Dos vinhos estudados são os da casta *Verdelho* que apresentam os valores médios mais elevados de acetato de isoamilo (Ac/A_{pi} de 1,39 a 3,68), contrariamente aos da casta *Boal* com áreas relativas médias da ordem dos 0,35 a 1,28. Verificou-se que dos três acetatos considerados, o acetato de isoamilo é o que apresenta valores médios de áreas relativas mais elevados constatando-se, durante o intervalo de tempo

considerado, um aumento dos teores de acetato de isoamilo nos vinhos Madeira estudados.

A figura 3.58 ilustra a existência de uma forte correlação entre os teores de acetato de isoamilo e a idade do vinho, traduzida pelo elevado valor do coeficiente de correlação ($r = 0,9072$). De acordo com Silva Ferreira (1998), este comportamento linear com a idade poderá ser consequência da evolução similar do ácido acético devido à oxidação do vinho.

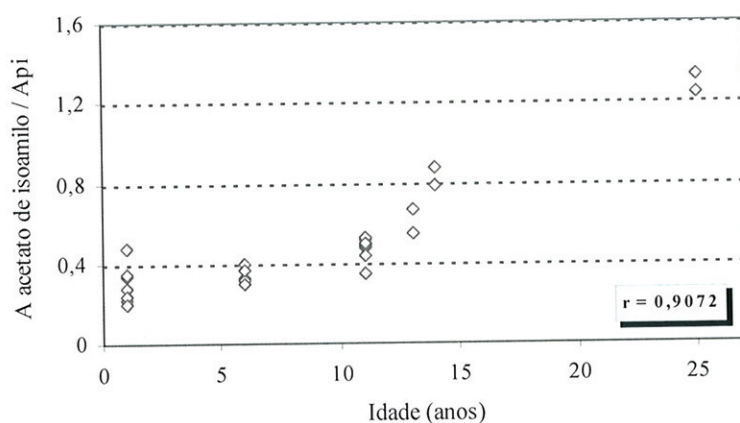


Figura 3.58 – Evolução dos teores de acetato de isoamilo verificada nos vinhos da casta Boal ($n=26$) ao longo do envelhecimento.

Nos primeiros 11 anos de envelhecimento, o aumento dos teores destes compostos, foi em média de $8,9 \pm 2,7$ % para os vinhos das quatro castas, com os vinhos da casta *Boal* a registarem o aumento mais significativo, $12,6 \pm 4,3$ %, contrariamente aos vinhos da casta *Malvazia* cujo aumento foi de apenas $4,2 \pm 1,3$ %. Nos 14 anos subsequentes, o aumento foi superior ao verificado durante os primeiros 11 anos, $26,1 \pm 6,4$ %, em média. Os vinhos das castas *Boal* e *Malvazia* com aumentos de $46,1 \pm 6,9$ % e de $34,7 \pm 6,3$ %, respectivamente, foram os que registaram um acréscimo mais acentuado. Para os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* o aumento foi de $14,3 \pm 2,9$ % e $21,5 \pm 4,5$ %, respectivamente.

Estes resultados contrariam os obtidos por Marais (1978), que constataram a diminuição dos teores dos acetatos de álcoois superiores ao longo do envelhecimento dos vinhos.

3.9.1.2 Ésteres etílicos de ácidos gordos

Relativamente à evolução dos ésteres etílicos dos ácidos gordos ao longo do envelhecimento, não há uma tendência notória. Para alguns investigadores (Simpson, 1978; Rapp e Güntert, 1985) os teores destes compostos aumentam no decurso do tempo de armazenamento, enquanto que para outros (Marais, 1978) ocorre um decréscimo.

Em qualquer dos vinhos Madeira das castas estudadas, verificou-se um decréscimo acentuado dos teores dos ésteres etílicos de ácidos gordos com o envelhecimento. Esta diminuição é significativa nos primeiros 11 anos, $45,5 \pm 11,7\%$, e menos acentuada nos 14 anos subsequentes, cujos teores diminuíram de $25,1 \pm 9,3\%$ (figura 3.59).

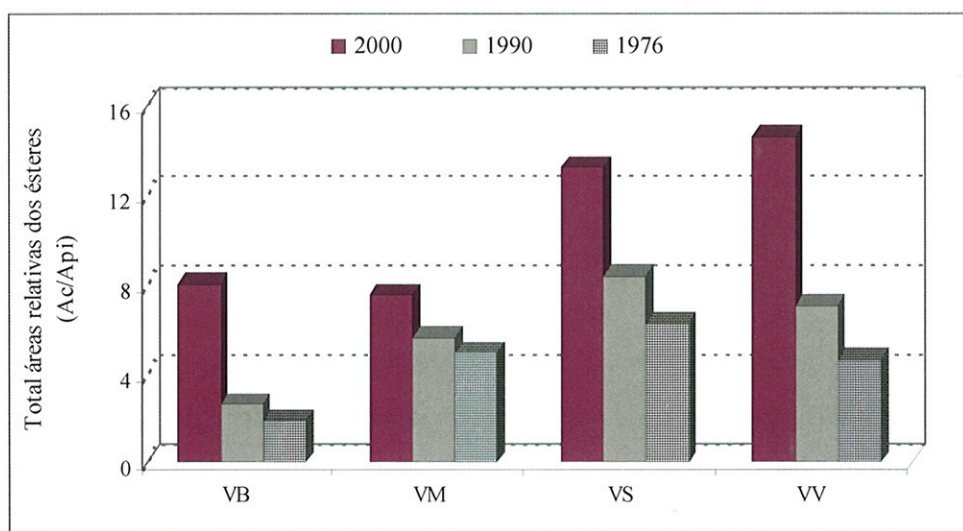


Figura 3.59 – Perfil da evolução dos teores de ésteres etílicos de ácidos gordos no decurso do envelhecimento para os vinhos das diferentes castas estudadas.

Os vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* apresentam uma cinética de hidrólise mais elevada, apresentando ao fim de 11 de anos de envelhecimento valores inferiores em $67,5 \pm 9,2\%$ e $52,0 \pm 7,9\%$, respectivamente, relativamente aos determinados para vinhos das mesmas castas com 8 meses de conservação. O decréscimo verificado nos teores de ésteres etílicos dos ácidos fixos foi de $25,7 \pm 5,3\%$ para os vinhos da casta

Malvazia e de $36,9 \pm 6,4$ % para os vinhos da casta *Sercial*. Nos 14 anos subsequentes (dos 11 aos 25 anos) a diminuição verificada é menos acentuada, correspondendo aos vinhos das castas *Boal*, *Sercial* e *Verdelho* o maior decréscimo $34,3 \pm 9,1$ %, $28,2 \pm 3,7$ % e $25,9 \pm 5,2$ %. Durante este período, o decréscimo verificado nos teores dos ésteres etílicos de ácidos gordos nos vinhos da casta *Malvazia* foi de $12,1 \pm 3,4$ %.

Apesar deste facto, os teores de decanoato de etilo aumentam com o envelhecimento contrariamente ao verificado para a maioria dos compostos deste grupo. A diminuição verificada para o hexanoato de etilo no intervalo de tempo considerado não é significativa.

O gráfico da figura 3.60 ilustra a evolução dos teores de octanoato de etilo ao longo do envelhecimento, para os 26 vinhos da casta *Boal*.

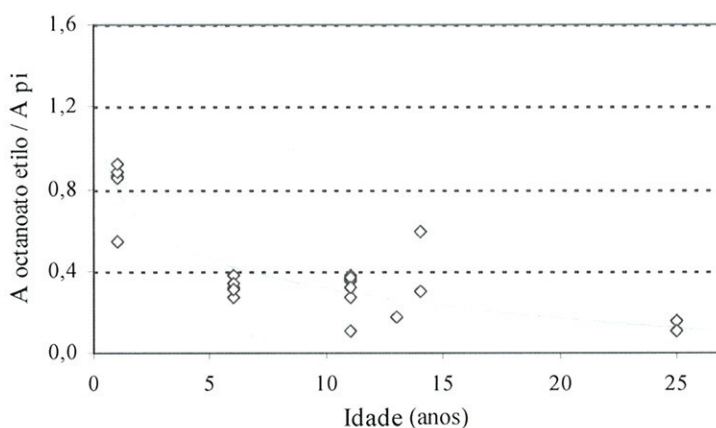


Figura 3.60 – Evolução dos teores de octanoato de etilo durante o envelhecimento, para vinhos da casta *Boal* ($n=26$).

Na tabela 6. AA (pág. 287), estão registados os valores extremos (mínimos e máximos) e médios das áreas relativas dos ésteres etílicos dos ácidos gordos, para os vinhos das diferentes castas, durante os 25 anos de envelhecimento.

A evolução observada para estes ésteres ao longo do envelhecimento, permite diferenciar por um lado o acetato de etilo cujos teores aumentam de modo aparentemente linear ($r=0,9151$) no intervalo de tempo considerado, dos outros ésteres cujos teores, genericamente, diminuem com o envelhecimento.

3.9.1.3 Ésteres etílicos de ácidos fixos

Os ésteres mono e dietílicos dos ácidos fixos formam-se, essencialmente, no decurso da conservação/envelhecimento do vinho por reacções de esterificação dos ácidos das uvas. Uma pequena quantidade é formada durante a fermentação.

Os valores extremos e médios das área relativas dos compostos deste grupo, determinados para os vinhos Madeira estudados encontram-se na tabela 3.21. Constatase um aumento significativo nos teores destes compostos no decurso do envelhecimento (figura 3.61).

O gráfico da figura 3.61 exemplifica, o comportamento verificado no decurso do envelhecimento para os ésteres etílicos de ácidos fixos, nos vinhos das diferentes castas.

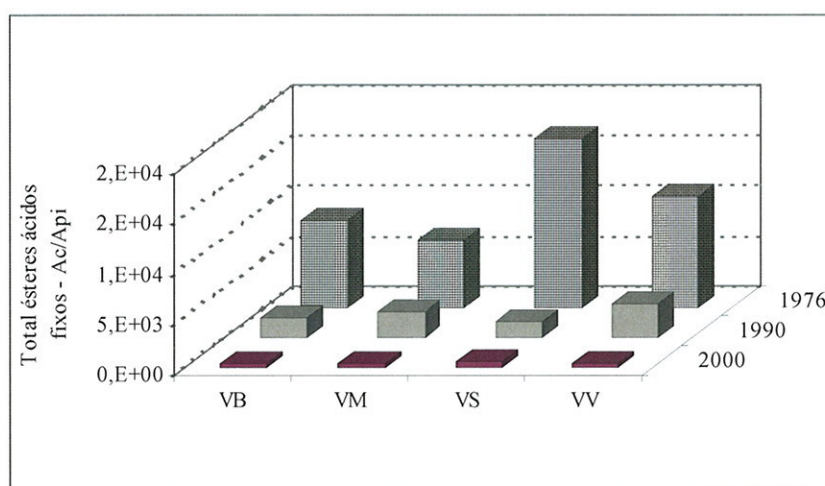


Figura 3.61 – Evolução dos ésteres etílicos de ácidos fixos durante o envelhecimento.

Durante o intervalo de tempo estudado (8 meses a 25 anos) e considerando os vinhos das diferentes castas, os teores dos ésteres etílicos de ácidos fixos aumentam, em média, $1158,6 \pm 17,1$ %. Nos últimos 14 anos (1990 a 1975) o aumento verificado foi mais significativo, $303,9 \pm 10,7$ %, do que nos primeiros 11 anos cujo incremento foi de $211,6 \pm 11,2$ %.

Nos primeiros 11 anos de envelhecimento são os vinhos da casta *Verdelho* que apresentam o aumento mais significativo, $748,9 \pm 3,7$ %. Embora menos acentuado, o

incremento verificado nos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Sercial* foi de $559,6 \pm 11,9$ %, $521,6 \pm 13,1$ % e de $197,5 \pm 9,3$ %, respectivamente.

Dos 11 aos 25 anos, correspondem aos vinhos da casta *Sercial* o aumento mais acentuado $664,6 \pm 14,7$ %. Durante o mesmo período, o aumento verificado nos vinhos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*, embora significativo, foi menos acentuado, $369,2 \pm 12,3$ %, $165,4 \pm 8,5$ % e $240,2 \pm 13,7$ %, respectivamente.

A tabela 3.21 mostra os valores extremos (mínimo e máximo) e médios das áreas relativas dos ésteres etílicos dos ácidos fixos nos vinhos das diferentes castas em estudo, no intervalo de tempo considerado (8 meses a 25 anos).

Tabela 3.21 - Evolução dos valores médios determinados para os principais ésteres etílicos dos ácidos fixos ao longo do envelhecimento do vinho Madeira.

Castas		Ésteres etílicos de ácidos fixos (Ac/Api)							
		Lac. Et.	SDE	SME	MDE	Pir. Et.	Glu. Et.	CE	TE
Boal	Min	53,6	22,5	71,2	37,3	0,8	0	0,2	0,7
	Máx	2563,8	3321,2	1862	1000,7	9,6	2,3	42,9	375,5
	\bar{x}	415,7	438,3	441,6	372,1	4,4	0,5	8,7	105,4
Malvazia	Min	38,8	23	84,1	107,6	1,2	0,03	0,1	1,8
	Máx	2443,8	1706,1	1783,2	1616,6	13,7	3,9	22,8	245
	\bar{x}	572,4	352,2	505,3	523,6	6,0	0,9	9,6	92,2
Sercial	Min	65,7	51,3	115,8	5529,9	1,4	0,04	0,07	1,3
	Máx	2456,7	3711,4	4766,1	63,6	4,7	3,5	96,4	589,3
	\bar{x}	441,6	594,7	805,5	880,9	2,5	0,9	15,8	125,8
Verdelho	Min	88,3	39,7	124	25,3	0,2	0	0	0,6
	Máx	1964,1	3565,6	4091,3	2098,4	6,7	8,4	29,5	256,4
	\bar{x}	547,3	744,2	712,7	576	3,3	1,6	8,7	100,9

Lac. Et.- lactato de etilo; SDE: succinato de dietilo; SME: succinato de monoetilo; MDE: malato de dietilo; Pir. Et.: piruvato de etilo; Glu. Et.: glutarato de etilo; CE: citrato de trietilo; TE: tartarato de dietilo.

Dos compostos que constituem este grupo, os succinatos de mono e dietilo, o malato de dietilo e o lactato de etilo, são os que mais contribuem para os aumentos verificados. Nos primeiros 11 anos de envelhecimento, os teores de succinato de dietilo aumentaram $625,9 \pm 16,3$ %, e os de succinato de monoetilo $272,1 \pm 12,7$ %. Para o malato de dietilo o aumento observado foi de $609,6 \pm 18,1$ % e para o lactato de etilo de $475,0 \pm 9,6$ %. Dos 11 aos 25 anos de conservação as variações mais significativas

verificaram-se no succinato de etilo, que apresentou um aumento de $466,9 \pm 14,2$ %, e no malato de dietilo cujo incremento neste período, de $229,7 \pm 13,4$ %, foi muito inferior ao verificado nos 11 primeiros anos de envelhecimento ($609,6 \pm 17,2$ %).

O lactato de etilo ocupa uma posição particular conferindo, de acordo com alguns autores, um odor a “manteiga” e a “leite azedo”, enquanto que para outros as notas aromáticas conferidas pelo lactato de etilo se assemelham à “framboesa” e ao “morango” (Etiévant, 1991). Tem a sua origem na fermentação maloláctica sendo também formado quimicamente ao longo do envelhecimento. O seu limiar de percepção olfativo nos vinhos é de 150 mg.L^{-1} . Os valores médios das áreas relativas do lactato de etilo determinados para os vinhos das castas *Malvazia* e *Verdelho*, são ligeiramente superiores aos determinados para os vinhos *Boal* e *Sercial*, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas.

Relativamente aos ésteres etílicos dos ácidos succínico e málico, os succinato e malato de dietilo, possuem limiares de percepção olfativos elevados, relativizando a sua participação no aroma global do vinho.

A figura 3.62 revela a existência de uma relação linear entre os ésteres do ácido succínico ao longo do envelhecimento, evidenciando o equilíbrio existente entre estas duas espécies nos vinhos.

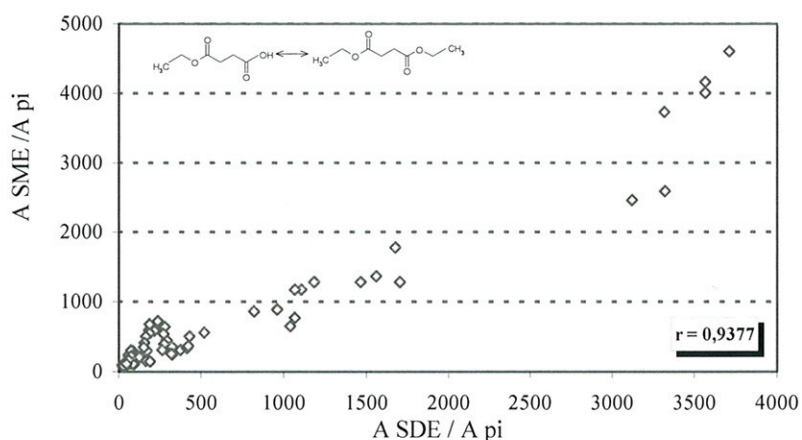


Figura 3.62 – Correlação entre o SME (succinato de monoetilo) e o SDE (succinato de dietilo) durante o envelhecimento dos vinhos Madeira ($n=86$).

Contrariamente ao observado nos vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial*, para as quais os valores médios das áreas relativas do succinato de etilo são significativamente

superiores aos do succinato de dietilo, nos vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* os teores de succinato de dietilo são ligeiramente superiores aos de succinato de etilo.

Os vinhos da casta *Sercial* são os que apresentam os valores médios mais elevados de malato de dietilo (880,9), contrariamente aos vinhos da casta *Boal* cujo valor médio é de 373,1.

Dos ésteres dos ácidos fixos o succinato de dietilo e o malato de dietilo, com coeficientes de correlação de 0,9510, e 0,9631, são os que melhor se correlacionam com o envelhecimento, fornecendo deste modo, uma boa indicação para a determinação da idade de um vinho.

A figura 3.63 mostra a evolução dos teores de malato de dietilo com a idade, para vinhos da casta *Boal*.

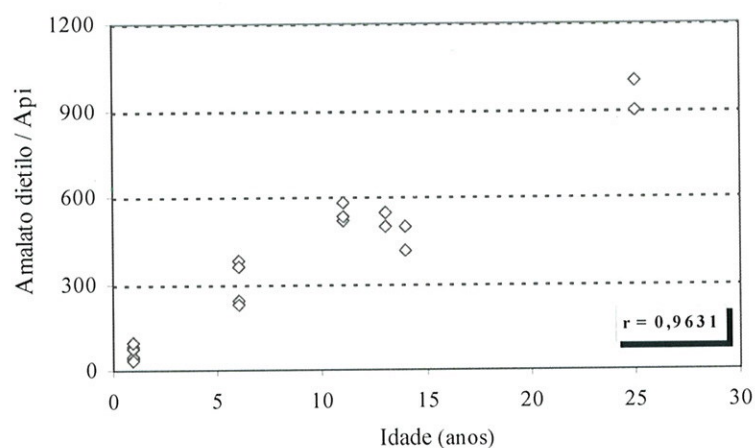


Figura 3.63 – Evolução dos teores de malato de dietilo ao longo do envelhecimento, para os 26 vinhos da casta *Boal*.

Não obstante os elevados limiares de percepção olfactiva (50-150 mg.L⁻¹) (Shinohara *et al.*, 1980), a participação de alguns destes ésteres na definição aromática dos vinhos mais velhos, não deve ser negligenciada.

Os aromas que estão associados a estes compostos são muito variados. Ao succinato de dietilo associam-se notas a “éter” ou a “fruta” (Williams *et al.*, 1983), ao malato de dietilo são associadas nuances a “maçã”, ao lactato de etilo odor láctico (manteiga, avelã, chocolate) e ao citrato de trietilo são atribuídos aromas a citrinos.

3.9.2 Fenóis voláteis

A figura 3.64 ilustra o comportamento dos fenóis voláteis ao longo do envelhecimento para os vinhos da casta *Boal* com 8 meses, 11 e 25 anos, respectivamente.

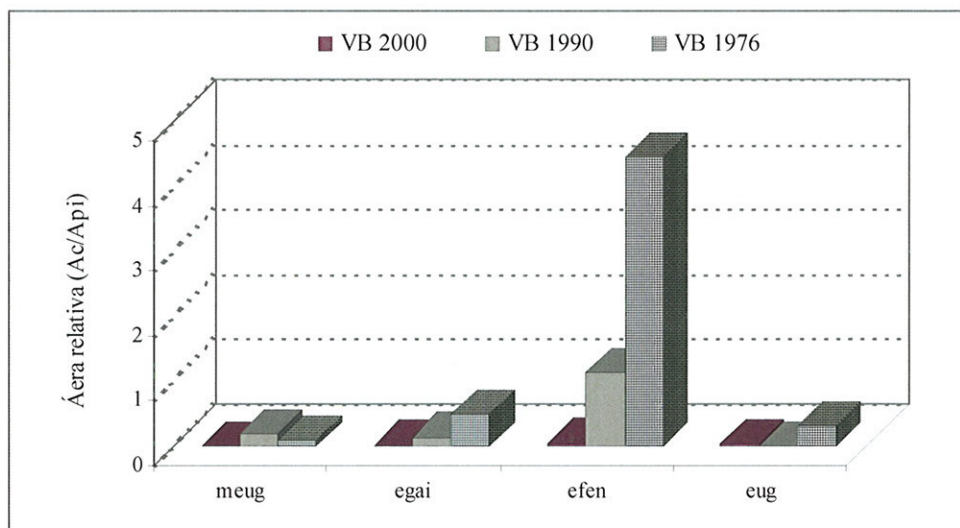


Figura 3.64 – Evolução dos teores dos fenóis voláteis, dos vinhos da variedade *Boal*, ao longo do envelhecimento.

Legenda: meug- metileugenol; egai- 4-etilguaiacol; efen- 4-etilfenol; eug- eugenol.

Em qualquer dos vinhos das castas estudadas, os teores fenóis voláteis aumentam, significativamente, durante o envelhecimento. Este aumento é devido, essencialmente, ao aumento verificado nos teores do 4-etilfenol.

O aumento é mais acentuado dos 11 aos 25 anos de envelhecimento, correspondendo aos vinhos *Sercial* o aumento mais significativo, $589,2 \pm 14,7$ %, contrariamente aos vinhos da casta *Verdelho* cujo aumento foi de apenas $74,5 \pm 11,4$ %.

3.9.3 Compostos carbonilados

De entre a complexidade aromática de um vinho, algumas substâncias, como os aldeídos, devido ao baixo limiar de percepção olfactive que possuem, da ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$, podem conferir aos vinhos notas aromáticas desfavoráveis (herbáceo, percevejo

e papel), podendo a sua presença, mesmo em baixas concentrações, ser prejudicial à qualidade organoléptica do vinho.

3.9.3.1 Etanal e benzaldeído

Formado por descarboxilação enzimática do ácido pirúvico durante a fermentação alcoólica, o etanal é o composto carbonilado maioritário no vinho Madeira (tabela 3.18), podendo nalguns casos atingir valores de algumas dezenas de mg.L^{-1} .

A sua formação depende significativamente da estirpe de leveduras, da composição do mosto e da temperatura de fermentação. Uma pequena quantidade é proveniente da oxidação do etanol. A sua evolução linear no decurso do envelhecimento é confirmada pelo elevado valor do coeficiente de correlação ($r=0,9314$).

Organolepticamente, o etanal pode influenciar de forma acentuada o aroma e o sabor de um vinho quando presente em quantidades superiores a 100 mg.L^{-1} , conferindo um odor, não muito agradável, a “frutos verdes”. Para teores superiores a 3 mg.L^{-1} confere ao vinho um odor desagradável que se assemelha a “amêndoas amargas”.

O benzaldeído, resultante essencialmente da oxidação do álcool benzílico, pode também ser proveniente das resinas epoxi utilizadas no revestimento de algumas cubas, que têm o benzaldeído como agente plastificante.

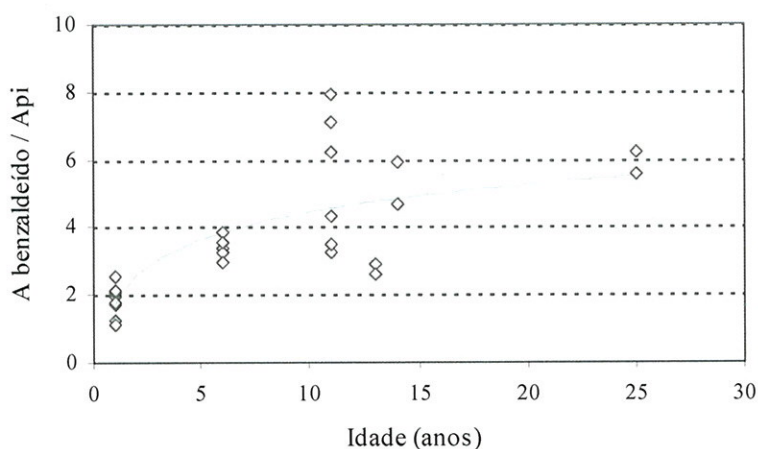


Figura 3.65 – Evolução dos teores de benzaldeído com a idade para os vinhos da casta Boal ($n=26$).

O gráfico da figura 3.65, ilustra a evolução deste composto ao longo do envelhecimento dos vinhos *Boal*.

3.9.3.2 Acetais

Para valores de pH correspondentes aos dos vinhos (3,0-3,5), os compostos carbonilados originam acetais por reacções de acetalização com os álcoois. A figura 3.66 exemplifica este tipo de reacção.

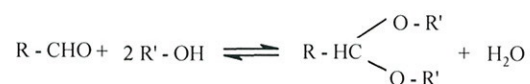


Figura 3.66 – Reacção de formação de um acetal.

Em vinhos fortificados e oxidados, a reacção de acetalização entre os aldeídos e os álcoois ou polióis como o glicerol, é favorecida tendo em consideração as quantidades relativamente elevadas dos reagentes. Geralmente, os teores em acetais detectados neste tipo de vinhos são superiores aos dos vinhos não oxidados.

De modo a avaliarmos o comportamento dos acetais heterocíclicos nos vinhos Madeira das diferentes castas em estudo ao longo do envelhecimento, analisaram-se 86 amostras de diferentes idades (entre 8 meses e 25 anos). Como solvente extractor foi usado o DCM, tendo-se injectado 1µL de extracto após desidratação com sulfato de sódio anidro seguido de concentração sob corrente de azoto. A quantificação foi efectuada em modo SIM (selecção de iões monotorizados), seleccionando os iões de massa $m/z=83$ para o padrão interno (octan-3-ol) e os iões de massa $m/z=103$ e 117 para os 1,3-dioxanos e 1,3-dioxolanos.

Dos acetais resultantes da acetalização entre acetaldeído e do glicerol, os *cis*- e *trans*-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano (*cis*- e *trans*-dioxolano) e os *cis*- e *trans*-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano (*cis*- e *trans*-dioxano), foram identificados nos vinhos das quatro castas estudadas. A identificação foi conseguida por comparação dos espectros

de massa obtidos com os existentes na base de dados da livreria NIST92 e com os indicados na literatura (Silva Ferreira *et al.*, 2002).

Na figura 3.67 está representado um cromatograma SIM ($m/z=103+117$) dos quatro acetais identificados, referente a uma amostra de vinho da Verdelho de 1990.

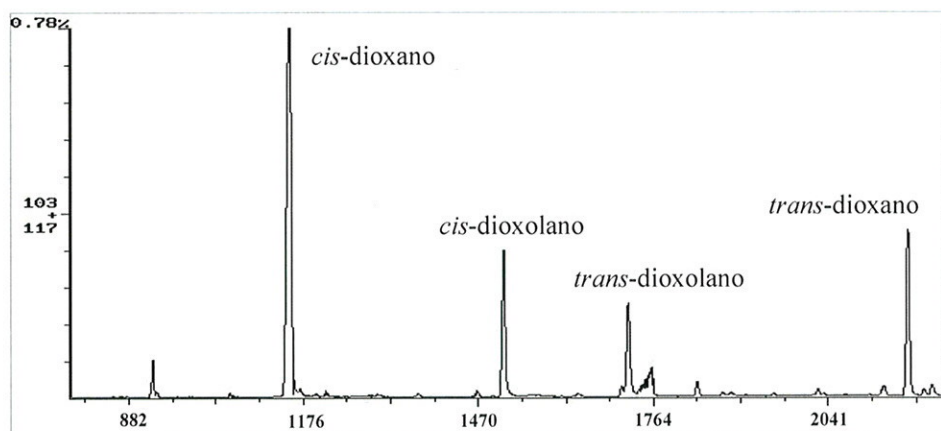


Figura 3.67 – Cromatograma SIM de um extracto de DCM de uma amostra de vinho Verdelho de 1990 (acetais: iões de $m/z=103 + 117$; octan-3-ol: ião de $m/z=83$). Coluna Stabilwax (Restek, (30 m \times 0,25mm i.d. \times 0,25 μ m d.f.).

Na tabela 7. AA (pág. 287) estão registados os espectros de massa para cada um dos acetais. Estes compostos já anteriormente foram identificados em diferentes tipos de vinho. A sua evolução nos vinhos do Porto é descrita com detalhe por Silva Ferreira (1998) e por Silva Ferreira *et al.*, (2002).

Os resultados obtidos para os quatro acetais considerados, indicam valores médios de 46,5 % e 22,7 % para o *cis*- e *trans*-1,3-dioxanos e de 19,5 % e 11,3 % para o *cis*- e *trans*-1,3-dioxolanos, respectivamente (figura 3.68). Estes valores não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, nível de confiança de 95 %) entre as quatro castas em estudo.

Para qualquer dos vinhos, verificou-se que das quatro formas isoméricas identificadas, o isómero *cis*-1,3-dioxano é o que apresenta teores mais elevados, e além disso, as formas *cis*- encontram-se sempre em quantidades superiores às correspondentes *trans*- (figura 3.68).

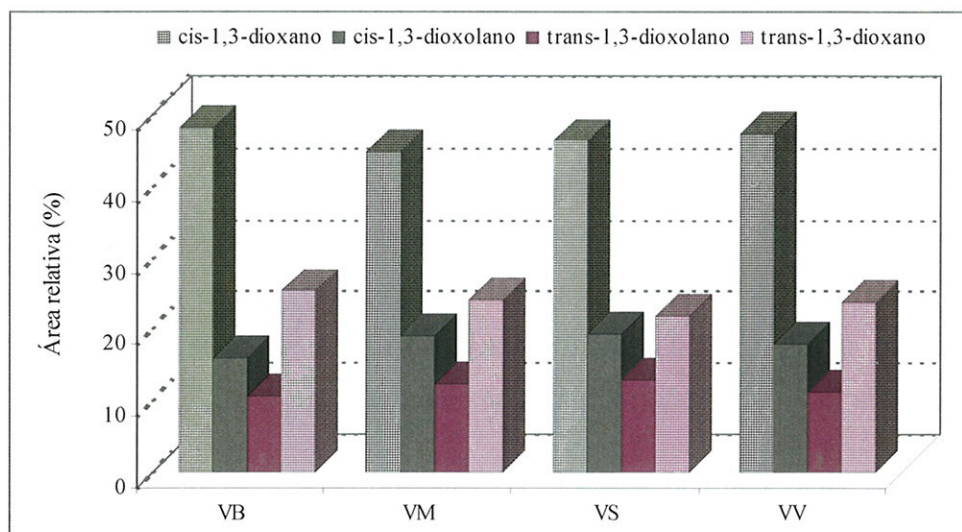


Figura 3.68 – Percentagem relativa (expressa em termos do padrão interno), dos quatro acetais presentes nas diferentes castas de vinho Madeira estudadas.

Em vinhos novos até 3 anos, aproximadamente, predominam os isómeros *cis*- e *trans*-1,3-dioxolanos, a partir deste período ocorre uma inversão com as formas isoméricas *cis*- e *trans*- dos dioxanos a aumentarem exponencialmente com a idade (figura 3.69), contribuindo ao fim de 11 anos de envelhecimento, com cerca de 70 % do total dos acetais heterocíclicos.

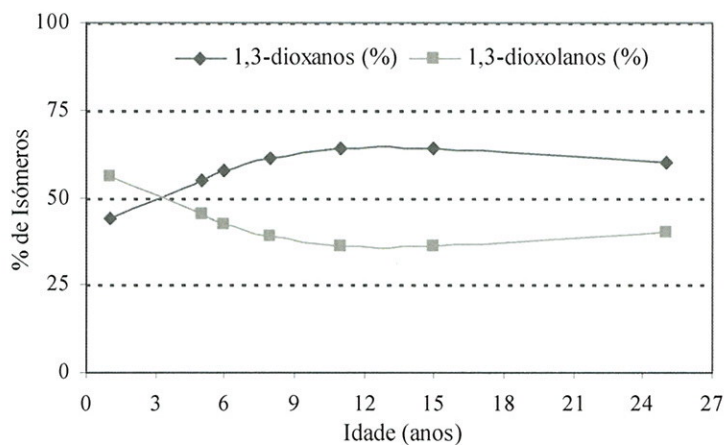


Figura 3.69 – Evolução das proporções relativas das formas isoméricas dos 1,3-dioxanos e 1,3-dioxolanos ao longo do envelhecimento.

Esta evolução é muito similar à observada por Silva Ferreira (1998) para vinhos do Porto.

A partir deste período, a proporção permanece praticamente constante sugerindo que os isómeros se encontram em equilíbrio termodinâmico.

Os elevados coeficientes de correlação ($r > 0,96$) obtidos para a razão *cis-/trans*-1,3-dioxanos e *cis-/trans*-1,3-dioxolanos, confirmam o pressuposto anterior e são indicadores da interconversão mútua destes isómeros (figura 3.70).

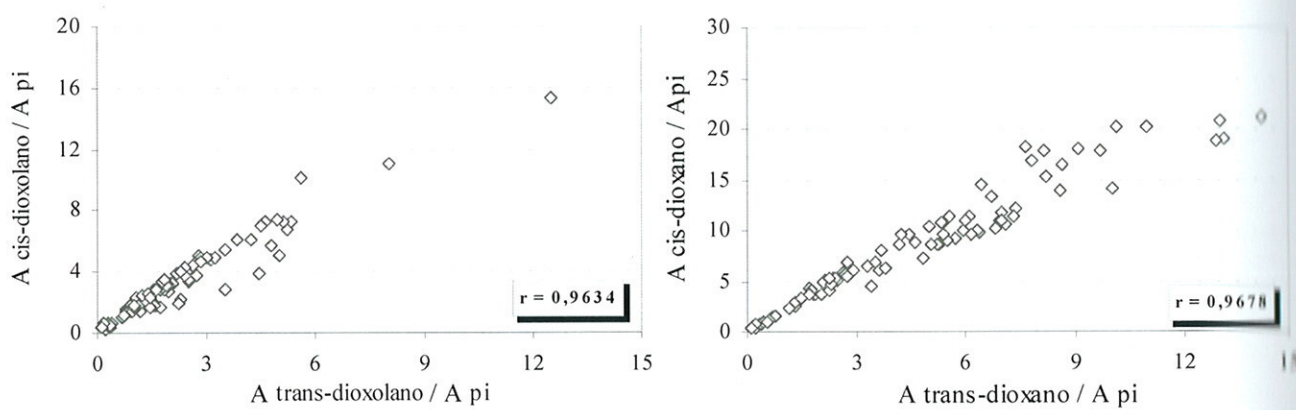


Figura 3.70 – Correlação entre as formas isoméricas dos acetais cíclicos do glicerol e do acetaldeído.

Verificou-se um comportamento similar na evolução dos acetais durante o tempo de armazenamento. Os valores obtidos para os coeficientes de correlação 0,9274 e 0,9213 para o par *cis*- e *trans*-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano e de 0,9309 e 0,9436 para os *cis*- e *trans*-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano, sugerem que os teores dos acetais aumentam linearmente com o tempo de envelhecimento (figura 3.71), pressupondo a possível utilização destes compostos como indicadores da idade do vinho Madeira. No entanto, poderão ser colocadas algumas reservas já que para um mesmo ano as concentrações relativas podem duplicar, caso dos vinhos com 11 anos.

A figura 3.71 representa a evolução dos teores dos quatro acetais cíclicos no decurso do envelhecimento.

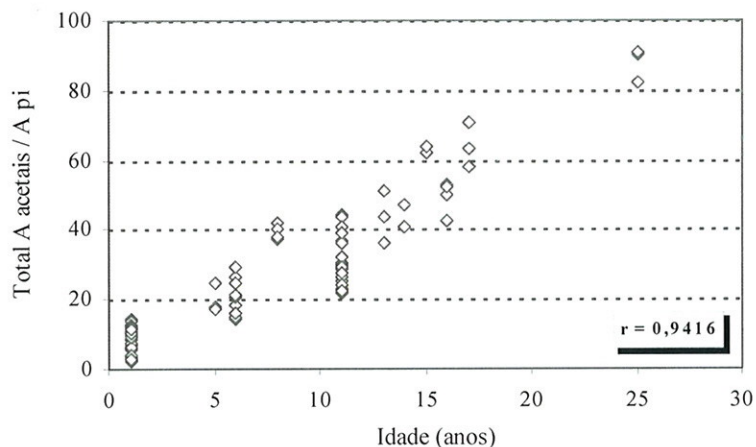


Figura 3.71– Evolução dos teores totais dos acetais do glicerol e do acetaldeído com a idade para os diferentes vinhos ($n=86$) estudados.

A razão entre os isômeros (*cis-/trans-*) permanece praticamente constante independentemente da idade dos vinhos. Os valores obtidos foram de $2,66 \pm 0,16$ para os *cis-/trans-1,3-dioxanos* e de $1,71 \pm 0,17$ para os *cis-/trans-1,3-dioxolanos*, no intervalo de tempo considerado (8 meses a 25 anos).

Do ponto de vista organoléptico, alguns investigadores (Etiévant, 1979, referenciado por Silva Ferreira, 1998; Williams e Strauss, 1978) defendem que os acetais têm um impacto aromático muito fraco ou mesmo nulo, enquanto que outros (Brock *et al.*, 1984; Simpson, 1980) atribuem-lhes nuances aromáticas do tipo “herbáceo” ou “acre, picante”.

3.9.3.3 Lactonas furânicas e pirânicas

Foram identificadas nos vinhos Madeira estudados, a γ -butirolactona, os isômeros *cis-* e *trans-* da 3-metiloctano-4-lactona conhecida pela “whisky lactona”, a 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona (pantolactona), a 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (DDMP) e a 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon). Esta última, pela sua importância aromática nos vinhos Madeira, será analisada isoladamente.

i) γ -butirolactona

Com um limiar de percepção olfactivo de 20 mg.L^{-1} , a γ -butirolactona é caracterizada por notas aromáticas pouco intensas a “manteiga”. É formada durante o processo fermentativo a partir do ácido glutâmico e derivados, e durante o envelhecimento a partir do ácido 4-aminobutírico (Silva Ferreira, 1998). No decurso do envelhecimento do vinho, os teores variam pouco verificando-se, no entanto, que os vinhos velhos apresentam teores ligeiramente superiores aos vinhos novos. A identificação deste composto, efectuada por GC-MS em modo de impacto electrónico apresentou um ajuste de 84,3 %. O índice de retenção calculado foi de 1756.

Dos 86 vinhos analisados são os vinhos das castas *Malvazia* e *Verdelho* os que apresentam, em média, os valores mais elevados das áreas relativas deste composto. Os vinhos das castas *Boal* e *Sercial* apresentam um valor médio de aproximadamente metade do valor determinado para os vinhos *Malvazia* e *Verdelho*. Na tabela 3.22 estão registados os valores extremos (mínimo e máximo) e médios das áreas relativas da γ -butirolactona, expressas em função do octan-3-ol.

ii) *Cis- e trans-3-metiloctano-4-lactona*

No decurso da conservação em cascos, a madeira de carvalho cede ao vinho compostos voláteis que intervêm no seu aroma. Poderão surgir notas aromáticas com nuances a “bosque”, “vegetal” e a “noz de coco”, explicadas pela presença dos isómeros *cis-* e *trans-* da 3-metiloctano-4-lactona, conhecida pela “whisky lactona”. O isómero *cis-* é mais odorante que o *trans-* e além do odor a “noz de coco” possui um carácter forte a “especiarias” (Chatonnet, 1995). Regra geral, os seus teores são superiores aos do isómero *trans-*. Em concentrações muito elevadas estes isómeros podem afectar negativamente o aroma dos vinhos conferindo-lhes um odor “resínico”.

A identificação destes isómeros nos extractos de diclorometano nos vinhos estudados, foi efectuada por GC-MS em modo de impacto electrónico. Os espectros de massa assim obtidos (figura 3.72), apresentaram um ajuste de 81,5 % para a *trans-3-metiloctano-4-lactona* e de 87,9 % para a *cis-3-metiloctano-4-lactona*, com a fragmentação proposta pela NIST92. O índice de retenção do isómero *trans-*, calculado na coluna *StabilWax*, foi de 1894 e o do isómero *cis-* de 1969.

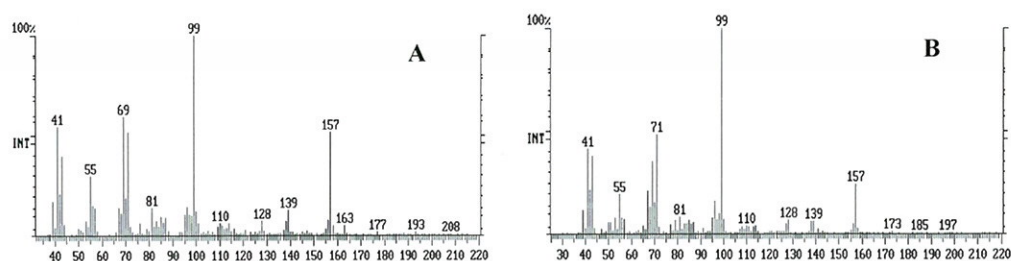


Figura 3.72 – Espectro de massa do isómero *cis*-whisky lactona –A, e *trans*-whisky lactona –B; do extracto orgânico de um vinho.

Os valores médios relativos determinados para as *cis*- e *trans*-whisky lactona, encontram-se na tabela 3.22. Verificou-se que as médias relativas do isómero *cis*- ($2,0 \pm 0,5$ para os vinhos das quatro castas) são muito superiores às determinadas para o isómero *trans*-, cujo valor médio, determinado para as quatro castas, foi de $0,25 \pm 0,06$.

Os vinhos da casta *Sercial* são os que apresentam o valor médio relativo mais elevado (2,8) da *cis*-whisky lactona. Enquanto que os valores médios da *trans*-whisky lactona determinados para os vinhos das diferentes castas são muito similares, variando de 0,2 (vinhos *Malvazia* e *Sercial*) a 0,3 (vinhos *Boal* e *Verdelho*).

iii) 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona

A presença nos vinhos da 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona (pantolactona) foi detectada pela primeira vez por Webb *et al.*, (1967). É produto do metabolismo do ácido pantoténico, uma vitamina do grupo B, no decurso da fermentação alcoólica. A figura 3.73 mostra um mecanismo possível para a formação da pantolactona.

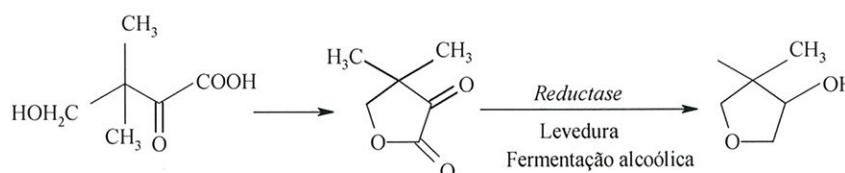


Figura 3.73 - Possível via de formação da 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona (adaptado de Silva Ferreira, 1998).

Os resultados obtidos, revelam uma tendência do tipo logarítmica com o envelhecimento do vinho. A figura 3.74, mostra essa evolução para as quatro variedades de vinhos estudadas.

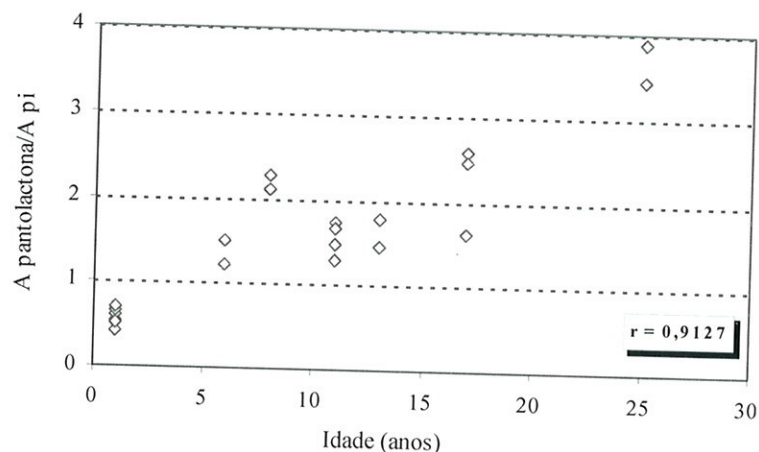


Figura 3.74 – Evolução dos teores de 2-hidroxi-3,3-dimetilbutano-4-lactona ao longo do envelhecimento dos vinhos Verdelho (n=21).

O espectro de massa do extracto orgânico obtido, apresenta um ajuste de 92,0 % com a fragmentação proposta pela NIST92. O seu índice de retenção calculado com a coluna *StabilWax* foi de 1934.

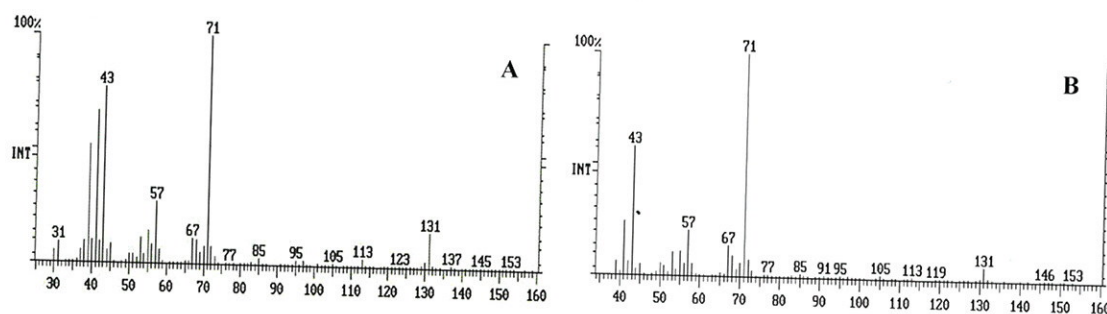


Figura 3.75 – Espectro de massa da pantolactona do extracto orgânico de um vinho -A; e espectro de massa da pantolactona da biblioteca NIST92 -B.

Os valores extremos (mínimo e máximo) e médios das áreas relativas da pantolactona, expressas em função do octan-3-ol, para as diferentes variedades de vinho Madeira estudadas, encontram-se registados na tabela 3.22.

Os valores médios determinados para os vinhos das diferentes castas estudadas são muito similares, variando de 1,4 (vinhos *Sercial*) a 1,6 (vinhos *Malvazia*). Durante o intervalo de tempo estudado, o aumento mais significativo, 80,7 %, verificou-se nos vinhos da casta *Verdelho*. Os vinhos das outras castas apresentaram uma evolução similar, $80,9 \pm 1,7$ %, durante os 25 anos de envelhecimento.

iv) 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona

Entre os compostos pirânicos foi detectada a DDMP. Esta lactona não possui odor característico. A sua origem está relacionada com o rearranjo dos intermediários de Amadori, resultantes da reacção entre uma hexose e um composto aminado (figura 3.76). A ciclização seguida de desidratação conduz à formação da DDMP.

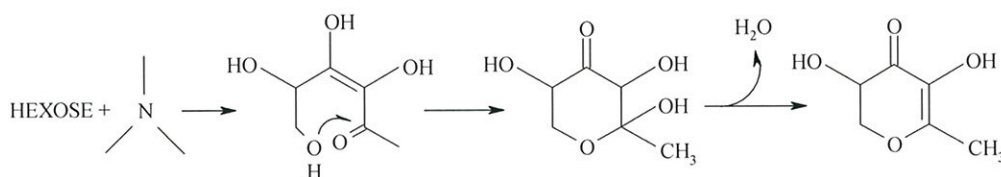


Figura 3.76 - Formação da 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (DDMP) de acordo com a reacção de Maillard (adaptado de Silva Ferreira, 1998).

A identificação deste composto nos extractos de diclorometano nos vinhos Madeira, foi efectuada por espectrometria de massa em modo de impacto electrónico (EI). O espectro de massa do extracto orgânico assim obtido (figura 3.77), apresenta um ajuste de 89,4 % com a fragmentação proposta pela NIST92. O seu índice de retenção, calculado na coluna *StabilWax*, foi de 2253.

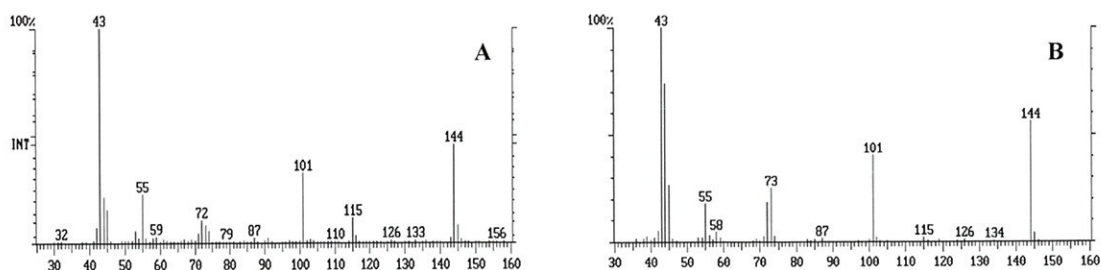


Figura 3.77 – Espectro de massa da 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (DDMP) do extracto orgânico de um vinho -A; espectro de massa da biblioteca NIST92 -B.

Relativamente a esta lactona pirânica, os valores relativos médios mais elevados foram determinados nos vinhos da casta *Malvazia* (1,9) contrariamente aos vinhos da casta *Sercial* para os quais foi calculado um valor médio de área relativa de 1,1.

Na tabela 3.22 encontram-se registados os valores, extremos e médios, das áreas relativas, expressas em função do padrão interno, das lactonas furânicas e pirânicas identificadas nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

Tabela 3.22 Valores extremos e médios das áreas relativas (expressas em função do octan-3-ol) das diferentes lactonas identificadas nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

Lactonas (Ac/Api)	Boal			Malvazia			Sercial			Verdelho		
	Min	Máx	\bar{X} (n=26)	Min	Máx	\bar{X} (n=22)	Min	Máx	\bar{X} (n=17)	Min	Máx	\bar{X} (n=21)
γ -butirolactona	0,3	0,7	0,4	0,3	1,9	0,8	0,07	0,6	0,3	0,03	3,4	0,8
cis-whisky lactona	0,2	4,6	1,5	0,02	8,8	2,1	0,2	17,9	2,8	0,03	11,5	1,7
trans-whisky lactona	0,2	0,4	0,3	0,06	0,5	0,2	0,03	0,4	0,2	0,08	0,5	0,3
pantolactona	0,5	2,9	1,5	0,5	2,6	1,6	0,6	2,9	1,4	0,4	3,9	1,5
DDMP	0,3	3,9	1,5	0,08	6,3	1,9	0,04	2,5	1,1	0,08	5,8	1,7

DDMP: 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona

3.9.3.4 Aldeídos Furânicos: furfural, 5-metilfurfural e 5-(hidroximetil)furfural

Estes compostos têm a sua origem, essencialmente, na degradação dos açúcares. Podem igualmente formar-se a partir da degradação térmica da celulose e hemiceluloses.

Os vinhos Madeira, particularmente os vinhos das castas *Malvazia* e *Boal*, caracterizam-se por possuírem grandes quantidades de açúcares residuais, principalmente glucose e frutose, precursores disponíveis para a formação dos aldeídos furânicos (Simpson, 1980). Os dois outros mecanismos podem explicar as concentrações mais elevadas encontradas nos vinhos com elevados teores em açúcares relativamente a outros vinhos menos ricos em açúcares.

Os valores extremos e médios encontrados para os aldeídos furânicos nas 86 amostras de vinhos Madeira das diferentes castas, são apresentados na tabela 3.23.

Tabela 3.23 Valores extremos (mínimo e máximo) e médios (n=86) das áreas relativas dos compostos furânicos determinados nos vinhos Madeira das diferentes castas estudadas.

Castas	Aldeídos furânicos (Ac/Api)				
	furfural	5-metilfurfural	HMF	EMF	
Boal	Min	0,8	0,02	2,9	0,0
	Máx	24,1	3,9	74,3	10,9
	\bar{X} (n=26)	8,6	0,7	29,1	2,4
Malvazia	Min	0,5	0,02	5,7	0,0
	Máx	23,3	1,9	100,3	13,2
	\bar{X} (n=22)	9,7	0,7	44,9	2,6
Sercial	Min	0,2	0,0	1,2	0,0
	Máx	29,0	2,9	59,1	11,9
	\bar{X} (n=17)	8,7	0,6	14,4	1,5
Verdelho	Min	0,3	0,05	0,7	0,0
	Máx	21,0	4,3	46,6	5,9
	\bar{X} (n=21)	8,5	0,9	14,7	1,5

HMF: 5-(hidroximetil)furfural; EMF: 5-(etoximetil)furfural

Verificou-se que os vinhos da casta *Malvazia*, são os que apresentam os valores médios mais elevados, com evidência para o valor do 5-(hidroximetil)furfural que é significativamente maior que o determinado para as outras castas.

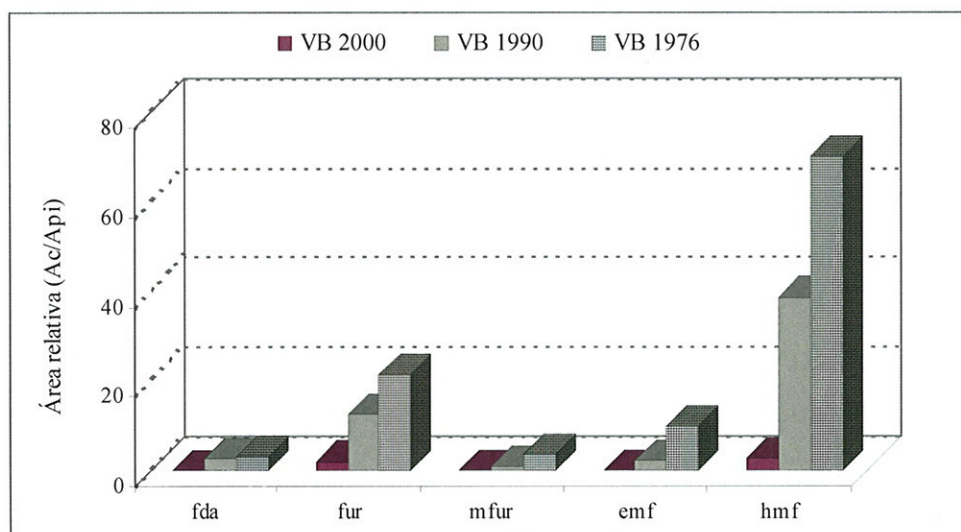


Figura 3.78 – Evolução dos aldeídos furânicos ao longo do envelhecimento nos 26 vinhos da casta Boal.

Legenda: fda- ; fur- furfural; m fur- 5-metilfurfural; emf- 5-(etoximetil)furfural; hmf- 5-(hidroximetil)furfural.

O gráfico da figura 3.78 exemplifica, para os vinhos da casta *Boal*, o comportamento evolutivo dos aldeídos furânicos ao longo do envelhecimento.

Verificou-se um aumento dos teores destes compostos no intervalo de tempo estudado, sendo mais significativo para o furfural e 5-(hidroximetil)furfural.

Os coeficientes de correlação calculados para o furfural, 5-metilfurfural e 5-(hidroximetil)furfural, 0,9213, 0,9061 e 0,9011, respectivamente, demonstram o comportamento linear destes compostos ao longo do tempo de envelhecimento (figuras 3.79 e 3.80), pelo que podem ser considerados marcadores da idade do vinho. Comportamento semelhante foi observado por Silva Ferreira (1998) para o vinho do Porto e por Rapp *et al.*, (1985).

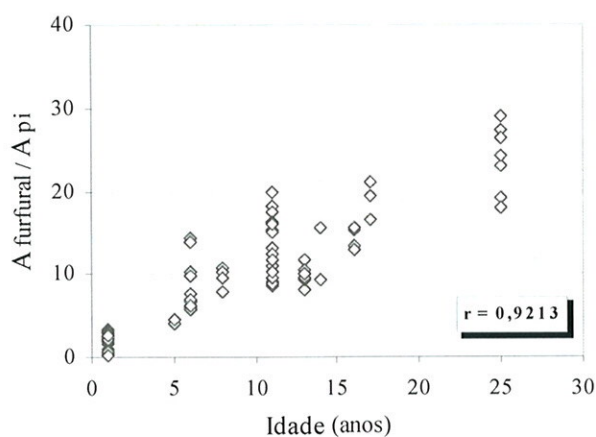


Figura 3.79 – Evolução do furfural com a idade ($n=86$).

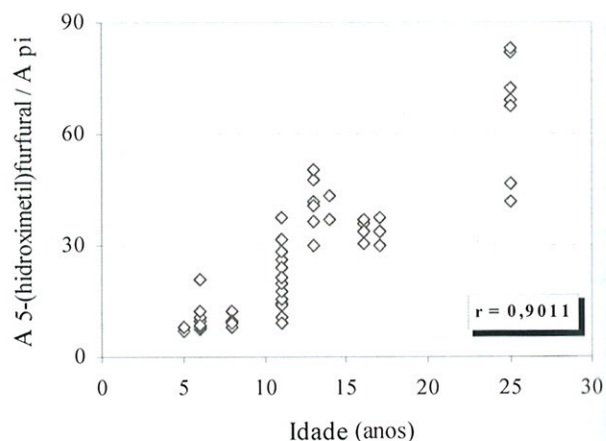


Figura 3.80 – Evolução do 5-(hidroximetil)furfural com a idade ($n=86$).

Apesar dos teores mais elevados nos vinhos velhos, o impacto olfactivo destes compostos no aroma característico do vinho Madeira velho parece ser reduzido.

A identificação do 5-(acetoximetil)furfural, efectuada por espectrometria de massa (figura 3.81), apresentou um ajuste de 84,2 % com a fragmentação proposta pela NIST92. O índice de retenção, calculado na coluna *StabilWax*, foi de 2128.

Dependendo da concentração em que se encontra nos vinhos, o 5-(acetoximetil)furfural é responsável por odores variados a “pimenta” e “especiarias”, podendo também conferir notas a “café”, a “pão branco” e a “fruta” (Cutzach *et al.*, 1999).

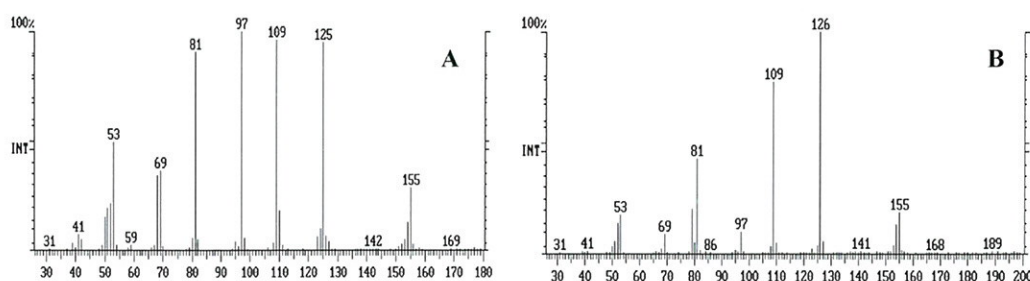


Figura 3.81 – Espectros de massa do extracto orgânico de um vinho do 5-(acetoximetil)furfural - **A**; e do 5-(etoximetil)furfural - **B**.

O comportamento observado para o 5-(etoximetil)furfural ao longo do envelhecimento, é idêntico ao observado para os outros aldeídos furânicos verificando-se um aumento aparentemente linear ($r=0,9120$) com o tempo de conservação. A figura 3.82 evidencia a forte correlação ($r=0,9516$) existente entre o 5-(etoximetil)furfural e o 5-(hidroximetil)furfural.

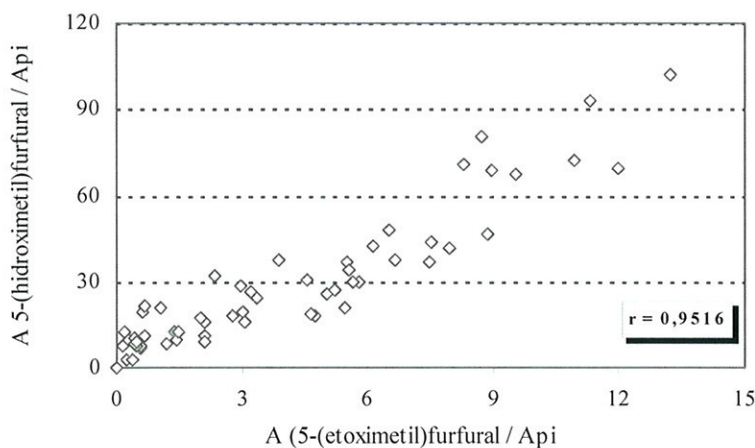


Figura 3.82 – Correlação entre as áreas relativas do 5-(etoximetil)furfural e do 5-(hidroximetil)furfural.

3.9.4 Sotolon

3.9.4.1 Identificação

O aroma típico que se desenvolve no decurso do envelhecimento do vinho Madeira é geralmente descrito por notas de “frutos secos”, “noz” e em particular

“especiarias”. Um dos compostos responsáveis por este tipo de aroma, de acordo com alguns autores (Silva Ferreira, *et al.*, 2003b) é a 4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona, comumente conhecido por *sotolon*.

A identificação deste composto nos extractos de diclorometano nas amostras de vinhos Madeira (processo de extracção descrito em 2.6.3.1 (pág. 98), foi efectuada por espectrometria de massa em modo de impacto electrónico (EI) de acordo com as condições do quadro I (pág. 95).

O espectro de massa do extracto orgânico assim obtido (figura 3.83), apresenta um ajuste de 86,7 % com a fragmentação proposta pela NIST92. O índice de retenção, calculado na coluna *StabilWax*, foi de 2209.

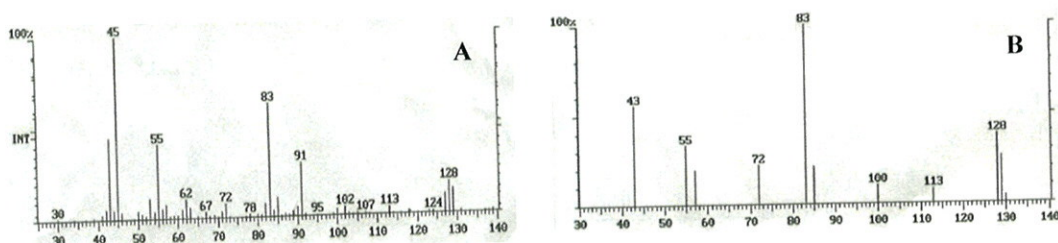


Figura 3.83 – Espectro de massa do *sotolon* do extracto orgânico de um vinho -A; e espectro de massa da biblioteca NIST92 -B.

O fragmento $m/z=128$ corresponde ao ião molecular, M^+ , o pico base apresenta uma razão $m/z=83$ correspondente ao núcleo da γ -lactona insaturada: $[M^+ - CO-OH]^+$, o fragmento $m/z=113$ corresponde à perda de um grupo metilo $[M^+ - CH_3]^+$ e o pico de $m/z=100$ resulta da perda de um grupo carbonilo $[M^+ - CO]^+$.

A análise olfatométrica (GC-O), efectuada na Escola Superior de Biotecnologia da UCP (Porto), a extractos de diclorometano de vinhos Madeira com 6, 11 e 25 anos de envelhecimento, de acordo o processo de extracção descrito em 2.6.3.1, revelou a existência de uma zona com um evidente aroma a especiarias, tanto mais forte quanto mais velho era o vinho. Esta evidência pressupõe o aumento da concentração do *sotolon* com o tempo de armazenamento, podendo este composto exercer uma importância aromática maior nos vinhos mais velhos.

3.9.4.2 Quantificação

Para determinar a concentração do sotolon presente nos vinhos Madeira, procedemos à extracção dos mesmos de acordo com o método descrito em 2.6.3.1 (pág. 98). A quantificação foi efectuada por GC-MS, em modo de impacto electrónico.

A quantificação foi feita por recurso ao cálculo do factor de resposta para o sotolon, cujo valor foi de 1090.

A reprodutibilidade do método foi avaliada efectuando 10 extracções de um vinho contendo $91,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de sotolon. O coeficiente de variação obtido foi de 4,9 %. A linearidade do método foi testada com 7 concentrações diferenciadas de sotolon entre 4 e $810 \mu\text{g.L}^{-1}$. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9980.

Os limites de detecção e quantificação foram de 1,17 e $2,02 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Os valores máximos e mínimos de sotolon encontrados para as diferentes castas de vinho Madeira estudadas, ao longo do envelhecimento (6 a 25 anos), encontram-se registados na tabela 3.24.

Tabela 3.24 Concentrações extremas (mínima e máxima) e médias de sotolon nos vinhos Madeira.

Casta	Concentração sotolon ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		\bar{x}
	mínimo	máximo	
Boal ($n=16$)	75,3	1390,5	645,7
Malvazia ($n=13$)	114,0	2001,2	998,1
Sercial ($n=8$)	47,2	1874,8	400,6
Verdelho ($n=13$)	259,6	1914,4	755,2

Nos vinhos das diferentes castas estudadas, com 8 meses de conservação, não foi detectada a presença de sotolon com o método utilizado.

É interessante notar que a formação do sotolon parece dependente do tipo de vinho (doce – *Malvazia*; meio doce – *Boal*; meio seco – *Verdelho*; seco – *Sercial*). Os valores médios aumentam do vinho seco (*Sercial*) para o vinho doce (*Malvazia*), denotando que a formação do sotolon é favorecida num meio rico em açúcares. Verificou-se que nos primeiros 11 anos de envelhecimento, o teor de sotolon nos

vinhos doces aumenta de um factor de $6,7 \pm 1,4$, enquanto que, nos vinhos secos este factor é de apenas $1,3 \pm 0,2$.

Esta evidência está de acordo com outros estudos (Silva Ferreira *et al.*, 2003b) que sugerem que o sotolon se forma a partir dos açúcares pela reacção de Maillard, resultado da condensação aldólica de moléculas como a butano-2,3-diona e hidroxiacetaldeído. Este facto é relevante devido ao elevado teor de açúcares, nomeadamente glucose e frutose, dos vinhos *Malvazia* e *Boal*, essencialmente.

Os teores de sotolon aumentam com o tempo de envelhecimento, de algumas dezenas de $\mu\text{g.L}^{-1}$ em vinhos com 6 anos de idade até algumas centenas de $\mu\text{g.L}^{-1}$ em vinhos com 25 anos. Os valores mais elevados, superiores a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, foram determinados nos vinhos com 25 anos de envelhecimento.

O alto coeficiente de correlação obtido ($r=0,9173$) demonstra a dependência da concentração do sotolon com o tempo de conservação possibilitando, deste modo, a sua utilização como “indicador da idade do vinho” (figura 3.84).

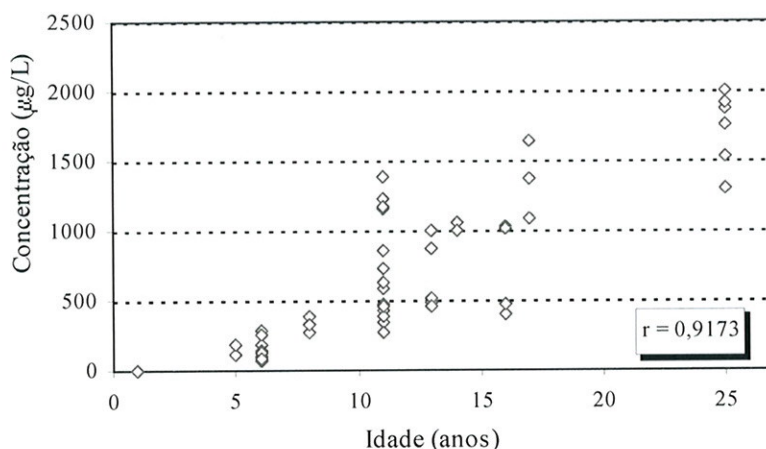


Figura 3.84 – Evolução da concentração do sotolon com a idade, nos diferentes tipos de vinhos Madeira ($n=86$).

Ao considerarmos os vinhos de cada casta, verificou-se uma maior correlação. Para os vinhos *Boal* o coeficiente de correlação obtido foi $r=0,9631$ e para os vinhos *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* os valores dos coeficiente de correlação foram $0,9325$, $0,9240$ e $0,9481$, respectivamente.

Verificou-se que os aldeídos furânicos, compostos provenientes da degradação dos açúcares, estão fortemente relacionados com o aparecimento do sotolon no decurso do envelhecimento. Esta evidência é comprovada pelos elevados valores de r obtidos: (HMF vs sotolon $r=0,9458$; furfural vs sotolon $r=0,9291$ e 5-metilfurfural vs sotolon $r=0,9442$), o que está de acordo com o facto destes compostos serem provenientes da degradação dos açúcares.

3.10 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO: HS-SPME vs DCM

Não sendo um dos objectivos iniciais, foi possível com o trabalho desenvolvido comparar a eficiência dos dois métodos utilizados na extracção dos diferentes compostos, a microextracção em fase sólida com fibra de poliacrilato por espaço de cabeça (HS-SPME) e a extracção líquido-líquido com diclorometano.

O gráfico da figura 3.85 mostra a comparação da eficiência de extracção, de cada um dos métodos analíticos utilizados, para os diferentes grupos de compostos químicos analisados.

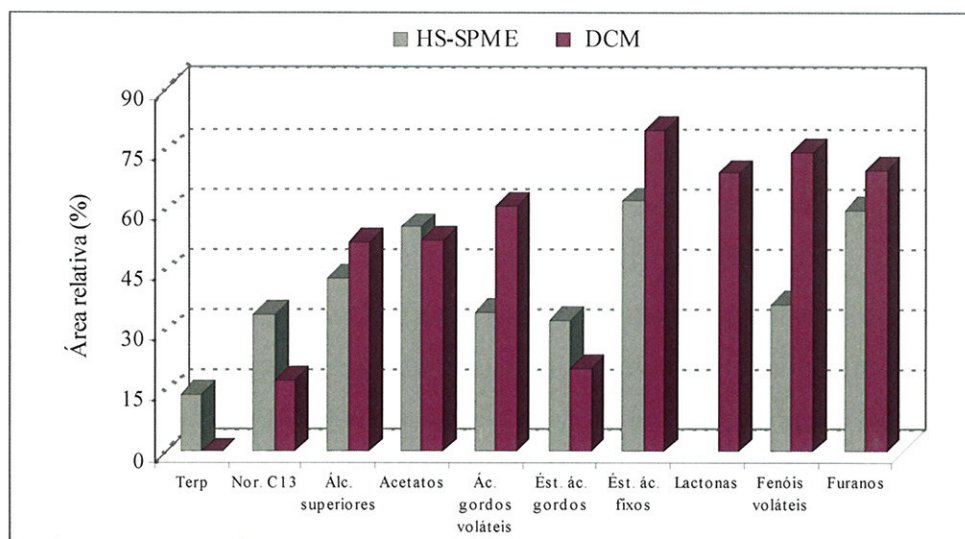


Figura 3.85 – Comparação da eficiência dos dois métodos utilizados na extracção dos diferentes grupos de compostos aromáticos.

Verificou-se de um modo geral, que a HS-SPME com fibra de poliacrilato revela-se mais adequada que a extracção líquido-líquido com diclorometano na extracção dos compostos terpénicos, norisoprenóides em C₁₃, ésteres etílicos de ácidos gordos e acetatos de álcoois superiores.

Relativamente aos álcoois superiores e furanos não existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios encontrados pelas duas técnicas, sendo no entanto ligeiramente superiores na extracção com diclorometano.

A extracção com diclorometano mostra-se mais adequada na extracção de lactonas (furânicas e pirânicas), dos ésteres etílicos dos ácidos fixos e dos fenóis voláteis.

3.11 ANÁLISE MULTIVARIÁVEL APLICADA AOS MOSTOS E AOS VINHOS MONOVARIETAIS

Neste trabalho, utilizou-se a análise de componentes principais (PCA)² com vista a explicar os resultados em função de um novo conjunto reduzido de variáveis. É uma técnica exploratória que nos permite explicar as principais fontes de variabilidade do conjunto inicial de dados e estabelecer relações entre as amostras (objectos) e os compostos (variáveis).

A análise de componentes principais permite extrair a informação mais importante (variância) contida no conjunto de dados originais, reduzindo a dimensionalidade dos mesmos a um conjunto de vectores próprios ortogonais, de forma que, a partir de um conjunto de indivíduos (mostos e vinhos) e de um conjunto de variáveis quantitativas, é possível projectar num espaço de poucas dimensões um grupo de indivíduos ou de variáveis, e obter uma representação da proximidade destes pontos. Permite também destacar a existência de subgrupos dentro do conjunto inicial de objectos, evidenciando as variáveis que mais contribuem para essa diferenciação.

O critério utilizado na selecção do número de componentes principais necessários para representar adequadamente os dados iniciais, baseou-se na percentagem da variância explicada, procurando o grupo de variáveis que maximizasse a percentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais e

² PCA : do Inglês Principal Component Analysis

que permitisse a distinção adequada dos objectos. Por uma questão de uniformização dos resultados, as tabelas serão apresentadas com um número de componentes que expliquem, pelo menos, 90 % da variância total do sistema.

A análise linear discriminante (LDA)³ utiliza-se para averiguar as características que distinguem os membros de um grupo dos de outro, de modo que, conhecidas as características de um novo objecto, se possa prever a que grupo pertence. Foi utilizado um método discriminante passo a passo (*stepwise*) no qual começámos por seleccionar as variáveis que mais contribuem para a diferenciação entre os grupos, e em seguida adicionámos e/ou retirámos variáveis nas funções discriminantes de modo a obter a melhor representação possível. Como critério de selecção de variáveis foi utilizado o valor da estatística lambda (Λ) de Wilks, com aproximação a χ^2 .

Todos os valores utilizados nas análises multivariável efectuadas (PCA e LDA) foram normalizados.

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da aplicação da PCA ao estudo dos vinhos de determinadas zonas para, em função da quantificação de certos compostos voláteis, encontrar uma semelhança ou diferenciação entre essas amostras de vinhos.

Neste trabalho aplicou-se a PCA aos mostos e aos vinhos estudados em função das variáveis que se identificaram e quantificaram, com o objectivo de diferenciar, se possível, as amostras em função da casta a partir da qual foram elaborados. Para isso, e dado o número de variáveis ser maior que o de indivíduos, formaram-se grupos de variáveis com compostos pertencentes à mesma família química – *terpenóis*, *álcoois superiores*, *ésteres etílicos de ácidos gordos*, comparando-se os vinhos das três vindimas elaborados a partir das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*.

3.11.1 PCA aplicada aos resultados dos monoterpenóis e norisoprenóides nos mostos

A análise dos teores dos monoterpenóis: linalol, α -terpineol, terpine-4-ol, citronelol, nerol, geraniol e farnesol, e dos norisoprenóides em C₁₃: β -damascenona e β -ionona, nos 36 mostos (9 de cada uma das castas – *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e

³ LDA : do Inglês Linear Discriminant Analysis

Verdelho) das colheitas de 1998, 1999, e 2000, e nos 36 vinhos monovarietais correspondentes produzidos no IVM, possibilitou por um lado, a obtenção de dados com grande interesse para a caracterização dos mostos e dos vinhos monovarietais das diferentes castas estudadas em função da casta de origem e por outro, permitiu avaliar a influência do ano de colheita no teor dos monoterpénóis e norisoprenóides. A análise de componentes principais apresenta-se como uma das técnicas mais adequadas para esse fim.

Com os dados obtidos das análises dos mostos por HS-SPME com fibra de poliacrilato PA-85 μm com posterior identificação e quantificação por GC-MS, construímos uma matriz designada de matriz *MostosVarietais*, representada na tabela 1 do anexo B (*tabela 1. AB; pág. 289*), composta por 10 variáveis e 36 objectos (10 \times 36) agrupados por casta de origem e ano de colheita. A este conjunto de variáveis foi aplicada a análise de componentes principais e a análise discriminante para caracterizar as castas identificando as variáveis que mais contribuem para a variância do conjunto de dados obtidos, e estabelecer relações entre os objectos (mostos) e as variáveis (monoterpénóis e norisoprenóides), identificando as variáveis que mais contribuem para essa diferenciação.

A análise multivariável (PCA e LDA) foi aplicada aos valores normalizados das concentrações ($\mu\text{g/L}$) dos compostos descritos.

A identificação das variáveis utilizadas na análise de componentes principais e na análise linear discriminante encontra-se descrita na tabela 3.25 tendo sido essa a correspondência utilizada em todas as análises multivariável efectuadas.

Tabela 3.25 Identificação das variáveis utilizadas na análise multivariável dos dados analíticos (*M – mostos, V – vinhos*).

Variável	Identificação	Amostra		Variável	Identificação	Amostra	
clinox	<i>cis</i> -óxido de linalol		V	dam	β -damascenona	M	V
tlinox	<i>trans</i> -óxido de linalol		V	ger	geraniol	M	V
efar	(<i>E,E</i>)-farnesal		V	ion	β -ionona	M	
lin	linalol	M	V	nero	nerolidol		V
ter	α -terpineol	M	V	far	farnesol	M	V
ter4ol	terpine-4-ol	M		vitis 1	vitispirano I		V
cit	citronelol	M	V	vitis 2	vitispirano II		V
neral	neral	M		TDN	TDN		V
ner	nerol	M					

Quando se aplicou a análise por componentes principais à matriz *MostosVarietais* (tabela 1. AB; pág 289), a percentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais foi de 82,1 %. Distinguem-se no 1º componente principal o α -terpineol, a β -damascenona, o neral e o linalol, que contribuem com 47,0 % para a explicação da variância total do sistema inicial de dados. No 2º componente principal, que explica 35,1 % da variância total, a β -ionona, o citronelol e o geraniol, são as variáveis que têm maior peso.

Com este conjunto de variáveis a distinção dos objectos de acordo com a casta de origem é pouco nítida, o que prova a existência de variáveis que dificultam a interpretação e não têm um valor significativo nos resultados.

Como técnica supervisionada que é, a PCA permite-nos construir novas matrizes de dados a partir da inicial, em que sejam sucessivamente retiradas (*backward*) ou adicionadas (*forward*) variáveis, de acordo com um critério de extracção adoptado, até que se obtenha o conjunto de variáveis mais adequado que melhor descreva a situação. Passo a passo, foram retiradas as variáveis terpine-4-ol, nerol e farnesol, o que revelou uma melhoria significativa na percentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes.

A análise de componentes principais efectuada agora com as 7 variáveis e os 36 objectos, originou a obtenção de dois componentes principais (aos quais correspondem valores próprios superiores a 1), que descrevem 91,3 % da variância total da amostra (tabela 3.26).

Tabela 3.26 Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos com as 7 variáveis.

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	4,1	54,7	54,7
2	2,3	36,6	91,3

A figura 3.86 mostra que as variáveis que têm maior peso no 1º componente principal (54,7 % da variância total) são o α -terpineol, a β -damascenona, o neral e o linalol, este último com peso negativo no 2º componente principal (tabela 2.AB; pág.290).

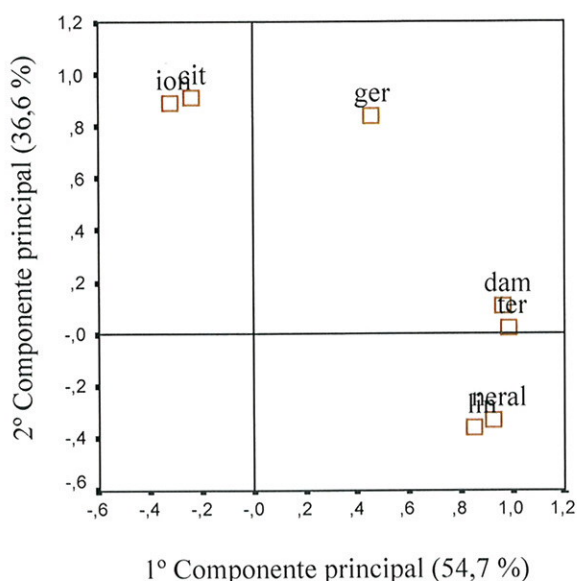


Figura 3.86 - Projecção bidimensional da influência das 7 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total do sistema.

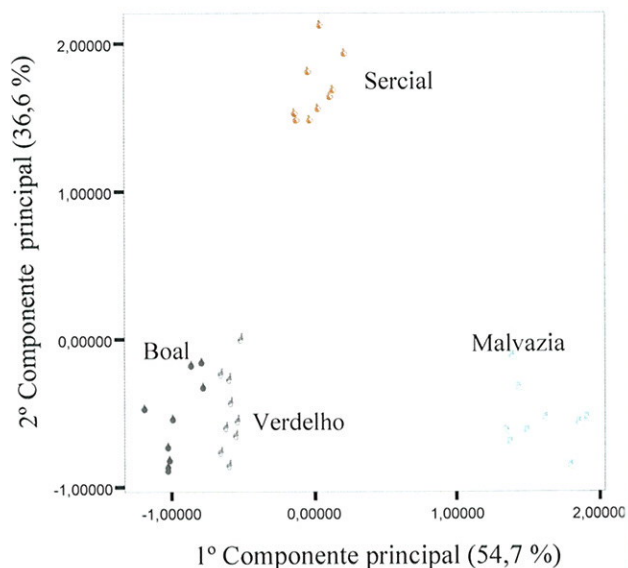


Figura 3.87 - Projecção bidimensional dos 36 mostos estudados identificados por casta, nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total da amostra.

O 2º componente principal (36,6 % da variância total) é explicado pelo citronelol, β -ionona e geraniol (tabela 2.AB; pág. 290).

A projecção bidimensional dos 36 mostos nos dois primeiros componentes principais (figura 3.87) mostra que, com as 7 variáveis em estudo, é possível diferenciar os diferentes mostos de acordo com a casta de origem. Verificou-se ainda que os mostos da casta *Sercial*, se posicionam ao longo do 2º componente principal (valores positivos), sendo, por isso, mais afectados pelas variáveis citronelol, β -ionona e geraniol.

Os mostos das castas *Boal* e *Verdelho* (figura 3.87) projectam-se para valores negativos do 2º componente principal sendo afectados, essencialmente pelo linalol. É pouco nítida a separação entre estes dois grupos objectos.

Aos mostos da casta *Malvazia*, situados para valores positivos do 2º e negativos do 1º componentes principais, associam-se as variáveis citronelol e β -ionona, esta última com teores superiores ao seu LPO ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) pelo que contribuirá com nuances florais para o aroma global do mosto *Malvazia*.

Utilizando o teste de comparações múltiplas LSD (*tabela 3. AB; pág. 290*), verificámos que para um nível de confiança de 95 % existem diferenças significativas entre todos os mostos ($p < 0,05$) em função do 1º componente principal. Os valores de significância obtidos para o 2º componente principal permitem deduzir que existem diferenças estatisticamente significativas entre o mosto da casta *Sercial* e os mostos das outras castas, enquanto que os mostos das castas *Boal*, *Malvazia* e *Verdelho*, não se diferenciam ($p > 0,05$) em função deste componente (*tabela 3. AB; pág. 290*).

A não existência de diferenças estatisticamente significativas entre os anos (1998, 1999 e 2000) em função dos dois primeiros componentes principais (*tabela 4. AB; pág. 291*), revela que estes não influenciam a separação verificada entre as castas. A figura 3.88 mostra que não é o factor ano que está na base da distinção entre os quatro grupos uma vez que, em cada grupo existem objectos dos diferentes anos estudados.

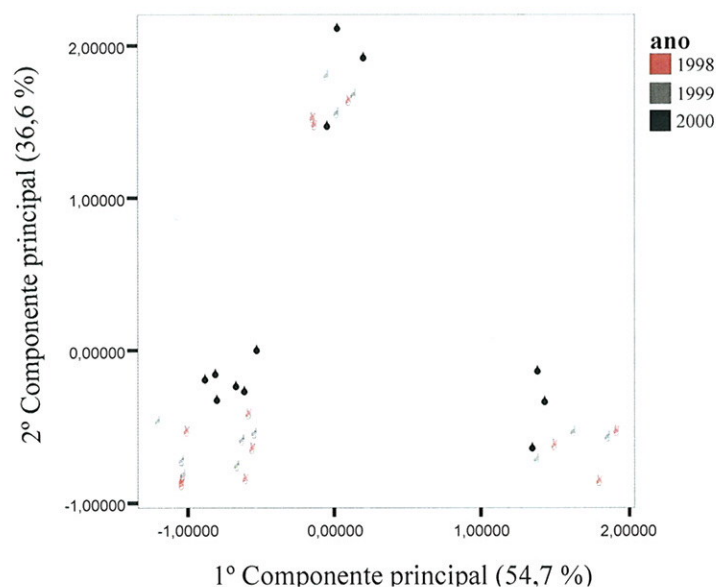


Figura 3.88- Projecção bidimensional dos 36 mostos estudados identificados por anos, nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,3 % da variância total da amostra.

As uvas destas quatro castas são provenientes do mesmo campo experimental (Ponta do Pargo - Direcção Regional da Agricultura), pelo que na diferenciação dos objectos, são minimizados os efeitos do “terroir”. Assim as diferenças encontradas na composição varietal são devidas apenas à casta.

3.11.2 LDA aplicada aos resultados dos terpenóis nos mostos

Para encontrar funções de variáveis que permitam discriminar os mostos de acordo com a casta de origem, recorreremos à análise discriminante linear. Os pressupostos requeridos para esta análise – *normalidade das variáveis* e *homogeneidade das variâncias*, foram avaliados pelos teste de Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Levene no procedimento da *Anova*.

A análise discriminante foi aplicada ao conjunto das 7 variáveis que, na análise de componentes principais, explicaram a maior percentagem de variância.

A aplicação desta técnica às 7 variáveis e aos 36 objectos da matriz *MostosVarietais*, forneceu três funções discriminantes que representam 100 % da variabilidade total inicial como descrito na tabela 3.27.

Tabela 3.27 Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante à matriz *MostosVarietais*.

Função discriminante	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa	Correlação canónica	Wilks Lambda	χ^2	g.l.	Nível de significância
1	68,9	61,1	61,1	0,993	0,000	300,2	24	0,000
2	30,8	27,3	88,4	0,984	0,002	177,1	14	0,000
3	13,1	11,6	100,0	0,984	0,07	76,7	6	0,000

χ^2 - qui-quadrado; g.l. – graus de liberdade

Na 1ª função discriminante, a que maior poder tem de separar os grupos (61,1 % da variabilidade total), as variáveis com maior contribuição são o neral e o α -terpineol.

Na 2ª função discriminante (27,3 % da variabilidade total), a β -ionona surge como a variável com maior peso, seguida do citronelol e do geraniol com contribuições idênticas mas inferiores à da β -ionona. A 3ª função discriminante (11,6 % da variabilidade total), é essencialmente influenciada pelo linalol e pela β -damascenona (*tabela 5. AB*).

Da análise de variância (*Anova*) aplicada às três funções discriminantes obtidas, constata-se que as diferenças entre as médias das três funções são estatisticamente significativas. A aplicação do teste de comparações múltiplas LSD, revelou a existência

de diferenças significativas entre todos os mostos em função de cada uma das funções discriminantes.

A projecção bidimensional dos objectos nos planos definidos pelas 1ª e 2ª funções discriminantes, mostra que as duas primeiras funções permitem agrupar adequadamente os mostos de acordo com a casta de origem.

A capacidade de classificação das variáveis foi avaliada procedendo-se à análise discriminante de uma matriz com objectos não definidos em nenhum dos grupos. Obteve-se uma função discriminante que classifica correctamente 100 % (8/8) dos objectos não classificados (*tabela 6. AB; pág 292*).

Na figura 3.89 podem visualizar-se os elementos não identificados *à priori* integrados nos grupos respectivos.

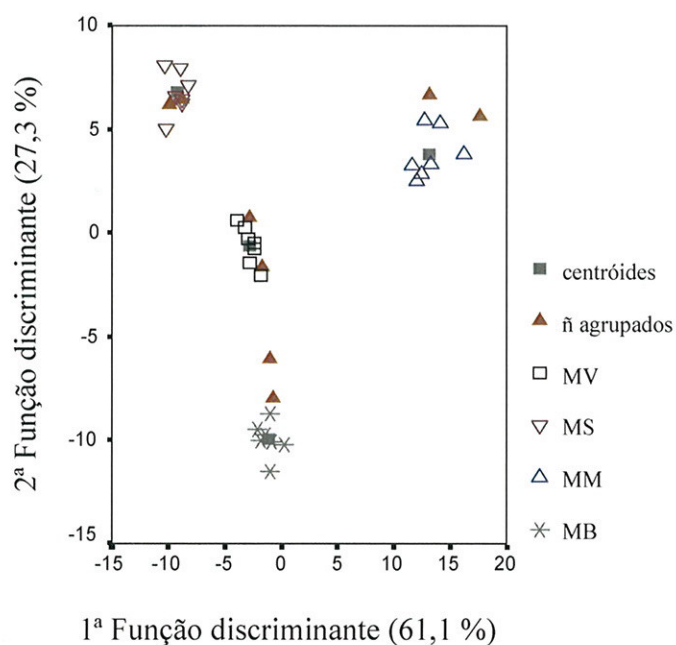


Figura 3.89 - Projecção bidimensional das duas primeiras funções discriminantes dos mostos, na qual se visualizam os objectos não classificados *à priori*.

A classificação só é possível se forem utilizadas todas as variáveis estudadas, ou seja, a função discriminante obtida é uma função linear de todas estas variáveis, o que indica que, enquanto que as variáveis com maior poder discriminatório são, para o mosto *Boal*, o benzaldeído para o mosto *Malvazia* o linalol e a β -damascenona, para o mosto *Verdelho* o linalol, α -terpineol e benzaldeído, e para o mosto *Sercial* o geraniol e

o nerolidol. Estas por si só não conseguem discriminar os mostos, sendo necessário ter em consideração todas as outras variáveis.

3.11.3 PCA aplicada aos resultados dos terpenóis nos vinhos monovarietais

Efectuou-se a quantificação dos compostos referenciados na tabela 3.24 em 36 vinhos monovarietais (9 de cada casta: *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*), correspondentes aos mostos das colheitas de 1998, 1999, 2000.

Os dados obtidos por SPME com fibra de poliacrilato PA-85 μm com posterior identificação e quantificação por GC-MS, permitiram a construção de uma matriz designada de matriz *VinhosVarietais*, (tabela 7.AB; pág 293), composta por 13 variáveis e 36 objectos (13 \times 36) agrupados por casta de origem e ano de colheita. A este conjunto de variáveis foi aplicada a análise de componentes principais e a análise discriminante.

Similarmente ao descrito para os mostos, também neste caso foram retiradas, passo a passo, as variáveis *cis*-óxido de linalol, citronelol e vitispirano II de modo a obter um conjunto de variáveis que maximize a percentagem da variância explicada pelos dois primeiros componentes principais. A matriz *VinhosVarietais* ficou deste modo reduzida a 10 variáveis.

A aplicação da análise de componentes principais às 10 variáveis e aos 36 objectos (10 \times 36), permitiu a extracção de dois componentes principais, com valores próprios superiores a um, que explicam 89,9 % da variância total inicial (tabela 3.28).

Tabela 3.28 Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos com as 10 variáveis e 36 objectos da matriz *VinhosVarietais*.

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	3,6	45,4	45,4
2	3,5	44,5	89,9

A projecção bidimensional da influência das 10 variáveis nos dois primeiros componentes principais (figura 3.90), mostra que para o 1º componente principal (45,4

% da variância total), apresentam contribuições significativas o α -terpineol, o nerolidol, o *trans*-óxido de linalol, e em menor extensão o vitispirano I (com peso negativo nos dois componentes) e a β -damascenona. O 2º componente principal que descreve 44,5 % da variância total do conjunto de dados, está relacionado com o geraniol, farnesol, linalol e (*E,E*)-farnesal (tabela 8.AB; pág 294).

A projecção bidimensional dos 36 vinhos nos dois primeiros componentes principais (figura 3.91), mostra um agrupamento dos vinhos *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* de acordo com a casta de origem. Ou seja, é possível uma diferenciação dos vinhos, com as 10 variáveis envolvidas no estudo, em função dos dois primeiros componentes principais.

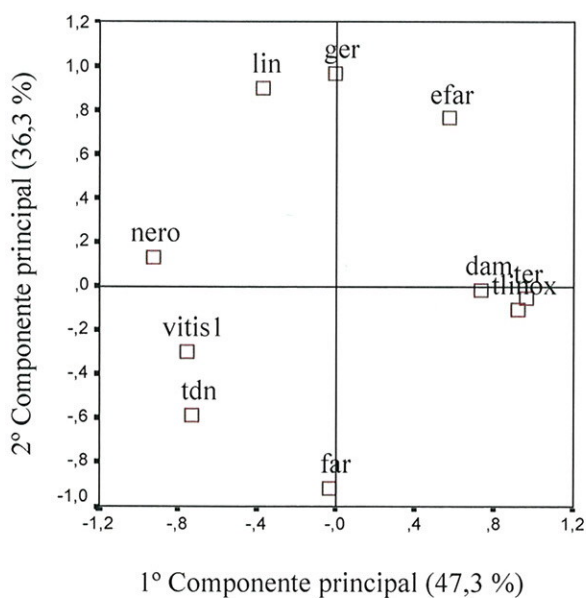


Figura 3.90 - Projecção bidimensional da influência das 10 variáveis da matriz *VinhosVarietais* nos dois primeiros componentes principais, que representam 89,9 % da variância total do sistema.

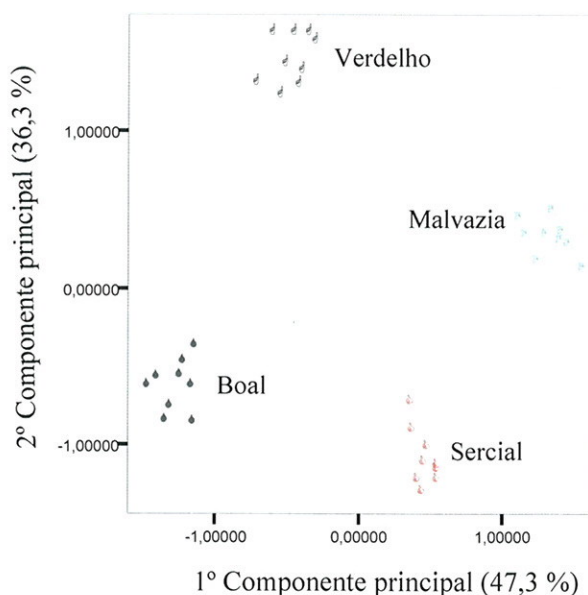


Figura 3.91 - Projecção bidimensional dos 36 vinhos estudados identificados por casta, nos dois primeiros componentes principais. Representam 89,9 % da variância total do sistema.

Esta observação é confirmada estatisticamente pela *Anova* (tabela 9. AB; pág 294), verificando-se que as médias das variáveis do 1º e 2º componentes principais diferem significativamente entre si quanto aos vinhos, o que possibilita a sua separação quando projectados num espaço bidimensional, como se pode verificar na figura 3.91.

Os vinhos da casta *Malvazia* estão posicionados ao longo do 1º componente principal (valores positivos), sendo afectados essencialmente pelo α -terpineol, nerolidol, *trans*-óxido de linalol, vitispirano I e pela β -damascenona. Esta apresenta um teor superior ao seu limiar de percepção olfactiva ($5\mu\text{g.L}^{-1}$) podendo deste modo contribuir com notas de flores e frutos exóticos para os vinhos desta casta.

Os vinhos da casta *Boal* projectam-se para valores negativos dos 1º e 2º componentes principais. Como se pode constatar pela matriz dos pesos factoriais, o farnesol, o TDN e o vitispirano I, são as variáveis que afectam negativamente esses componentes, pelo que são as variáveis mais associadas aos vinhos desta casta.

Influenciados por valores positivos do 1º componente principal e negativos do 2º, os vinhos da casta *Verdelho* estão associados, principalmente, ao α -terpineol, *trans*-óxido de linalol, β -damascenona, geraniol e linalol.

O gráfico da figura 3.92 mostra que o nerolidol, o geraniol e o linalol, com valores negativos no 1º e positivos no 2º componentes principais, são as variáveis que mais contribuem para os vinhos da casta *Sercial*.

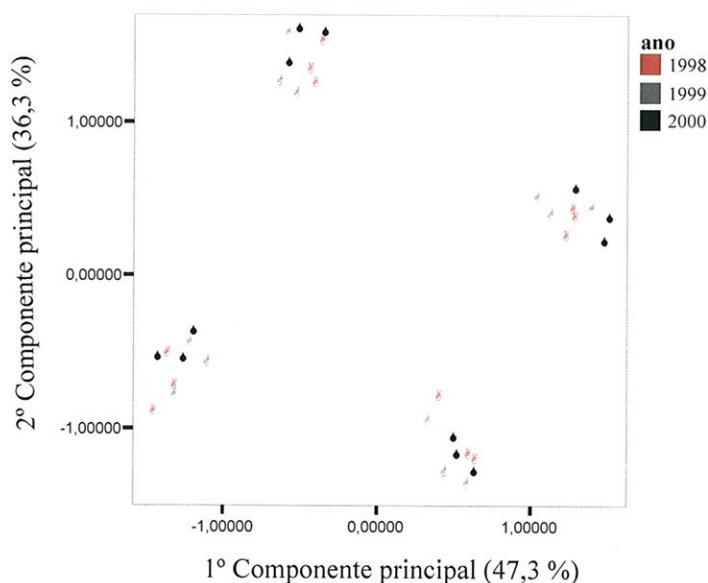


Figura 3.92 - *Projeção bidimensional dos 36 vinhos estudados identificados por ano de colheita, nos dois primeiros componentes principais, que representam 89,9 % da variância total da amostra.*

Tal como verificado para os mostos, também para os vinhos a *Anova* mostra que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os teores de monoterpénios e norisoprenóides nos três anos em estudo (1998, 1999 e 2000) para qualquer dos vinhos das castas em estudo, o que evidencia que não é o factor ano que está na base da distinção entre os quatro grupos uma vez que neles existem vinhos dos três anos das colheitas (figura 3.92).

3.11.4 LDA aplicada aos resultados dos terpenóis nos vinhos monovarietais

A aplicação da análise discriminante ao conjunto de variáveis que melhor explicam a variância da matriz dos dados, originou 3 funções discriminantes. Na 1ª função discriminante, que contribui com 90,9 % para a explicação da variabilidade total inicial (tabela 3.29), as variáveis com maior contribuição são o geraniol e linalol (tabela 10. AB; pág 295). Na 2ª função discriminante aparecem quatro variáveis. O (*E,E*)-farnesol e o α -terpineol apresentam contribuições idênticas e relativamente elevadas. Com peso inferior nesta função estão o TDN e o nerolidol. Para a 3ª função discriminante contribui significativamente a β -damascenona e em menor extensão o vitispirano I, o farnesol e o *trans*-óxido de linalol.

Tabela 3.29 Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante à matriz VinhosVarietais.

Função discriminante	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa	Correlação canónica	Wilks Lambda	χ^2	<i>g.l.</i>	Nível de significância
1	90,9	79,2	79,2	0,995	0,000	248,4	30	0,000
2	19,7	17,1	96,3	0,976	0,009	126,4	18	0,000
3	4,2	3,7	100,0	0,899	0,192	44,6	8	0,000

A *Anova* aplicada às três funções discriminantes obtidas, indica que as diferenças entre as médias das três funções são estatisticamente significativas

possibilitando deste modo discriminar adequadamente os vinhos em estudo de acordo com as castas de origem.

A capacidade de classificação das variáveis foi avaliada procedendo-se à análise discriminante de uma matriz com objectos não definidos em nenhum dos grupos (tabela 11. AB; pág 295). A percentagem de classificação obtida, 100 % (9/9), revela a adequação das 12 variáveis utilizadas na diferenciação dos objectos.

Na figura 3.93 podem visualizar-se os objectos não identificados à priori incorporados no correspondente grupo.

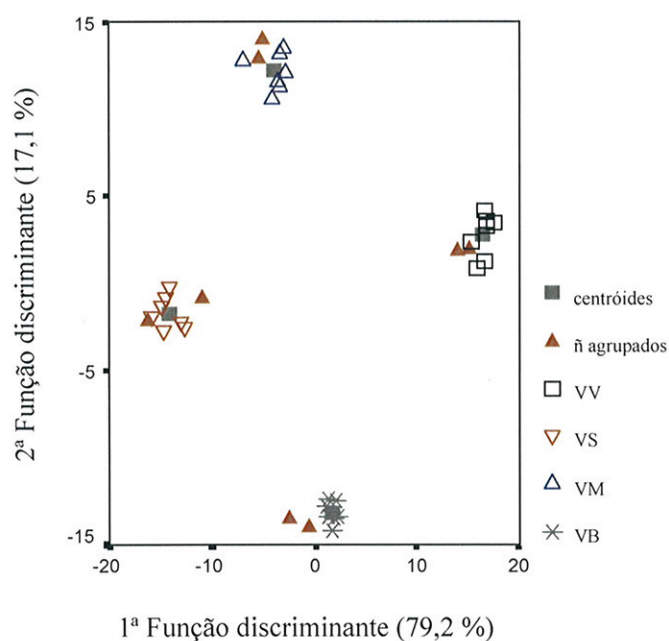


Figura 3.93 - Projecção bidimensional das duas primeiras funções discriminantes dos vinhos na qual se visualizam os objectos não classificados à priori.

Para os vinhos da casta *Boal* as variáveis com maior poder discriminatório são o (*E,E*)-farnesol, o α -terpineol o nerolidol e o vitispirano I, enquanto que o *trans*- óxido de linalol, o (*E,E*)-farnesol, o α -terpineol, o TDN e a β -damascenona para os vinhos da casta *Malvazia*, o α -terpineol, o geraniol, e o farnesol para os vinhos da casta *Sercial* e o geraniol, o α -terpineol e a β -damascenona, são as variáveis que mais contribuem para a sua discriminação.

A análise discriminante efectuada, permitiu discriminar quer os mostos quer os vinhos, conseguindo classificar correctamente 100 % de objectos não agrupados à priori, facto bastante relevante e que poderá ser importante no sentido de reprimir a prática de fraudes ou imitações que utilizam abusivamente a designação de “Vinho Madeira”.

As variáveis estudadas mostraram-se capazes de diferenciar as castas em estudo, facto que confere à quantificação destes compostos uma importância acrescida na definição das características da tipicidade das castas produtoras de vinho Madeira.

3.12 ANÁLISE MULTIVARIÁVEL APLICADA AOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS VINHOS MONOVARIETAIS

Com o intuito de verificar se os diferentes grupos de compostos aromáticos estudados, permitem a distinção e classificação dos vinhos monovarietais em estudo, aplicou-se a PCA e a LDA ao conjunto de variáveis mais representativas de cada grupo e constantes na tabela 3.30.

As variáveis foram reagrupadas em 5 grupos: *álcoois superiores*, *ácido gordos voláteis*, *ésteres etílicos de ácidos gordos*, *ésteres etílicos de ácidos fixos* e *compostos carbonilados*.

Cada um dos grupos representados foi objecto de uma análise de componente principal, seguindo-se uma análise ao conjunto de variáveis, que para cada grupo, explicam a maior percentagem de variância (compostos gerais). Este conjunto de variáveis foi ainda sujeito a uma análise discriminante.

A identificação das variáveis utilizadas encontra-se descrita na tabela 3.30, tendo sido essa a correspondência utilizada em todas as análises multivariável efectuadas.

As matrizes correspondentes a cada grupo encontram-se no Anexo C.

Tabela 3.30 Identificação das 42 variáveis utilizadas na análise multivariável aplicada aos compostos voláteis.

Variável	Identificação	Variável	Identificação
<i>Álcoois superiores</i>		dodeca	ácido dodecanóico
prop	propan-1-ol	benz	ácido benzóico
mprop	2-metilpropan-1-ol		
mbut	2+3-metilbutan-1-ol	<i>Ésteres etílicos ácidos gordos e fixos</i>	
but	butan-1-ol	C6C2	hexanoato de etilo
hex	hexan-1-ol	C8C2	octanoato de etilo
e3hex	(E)-hex-3-en-1-ol	C9C2	nonanoato de etilo
z3hex	(Z)-hex-3-en-1-ol	C10C2	decanoato de etilo
e2hex	(E)-hex-2-en-1-ol	deceet	cis-9-decenoato de etilo
z2hex	(Z)-hex-2-en-1-ol	benzacet	benzenoacetato de etilo
albenz	álcool benzílico	C12C2	dodecanoato de etilo
feoh	2-feniletanol	C14C2	tetradecanoato de etilo
		C16C2	hexadecanoato de etilo
		C18C2	octadecanoato de etilo
<i>Ácidos gordos voláteis</i>		lacet	lactato de etilo
eta	ácido etanóico	sde	succinato de dietilo
prop	Ácido propanóico		
mbut	ácido 3-metilbutanóico		
but	ácido butanóico	<i>Compostos carbonilados</i>	
dmm	ácido dimetilmalónico	nona	nonanona
hexa	ácido hexanóico	benzal	benzaldeído
etilhexa	ácido 2-etil-hexanóico	fur	furfural
hbprop	ácido 2-hidroxibenzenopropanóico	emf	5-(etoximetil)furfural
octa	ácido octanóico	hmf	5-(hidroximetil)furfural
nona	ácido nonanóico	butiro	γ-butirolactona
deca	ácido decanóico	pantol	pantolactona

3.12.1 PCA aplicada aos álcoois superiores

À semelhança do que fizemos para a matriz *VinhosVarietais*, se agora considerarmos as 11 variáveis que constituem o grupo dos álcoois superiores (*tabela 12. AB; pág. 296*), e projectarmos os 36 vinhos nos dois primeiros componentes com elas obtidos, obtemos um sistema em que os dois primeiros componentes principais explicam 81,2 % da variância total do sistema. Com o intuito de formarmos o conjunto de variáveis que maximizam a percentagem da variância explicada, foram sucessivamente retiradas e adicionadas, passo a passo, variáveis. Do conjunto das

variáveis que fazem parte do grupo dos álcoois superiores e que se encontram representadas na tabela 3.30, retiraram-se o propan-1-ol e o 2+3-metilbutan-1-ol. O novo conjunto de 9 variáveis assim formado, permite explicar 87,9 % da variância total. 62,2 % da variância é explicada pelo 1º componente principal. O 2º componente explica 25,7 % (tabela 3.31).

Tabela 3.31 *Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos três primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos das diferentes castas com as 9 variáveis da Matriz Álcoois Superiores.*

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	5,7	62,2	62,2
2	2,3	25,7	87,9
3	0,6	7,0	94,9

O 1º componente principal é explicado maioritariamente pelo álcool benzílico, pelo 2-feniletanol e pelo (*E*)-hex-3-en-1-ol e em menor extensão pelo 2-metilpropan-1-ol, hexan-1-ol e (*Z*)-hex-2-en-1-ol. Os álcoois (*Z*)-hex-3-en-1-ol e (*E*)-hex-2-en-1-ol, são as variáveis associadas ao 2º componente principal.

Na figura 3.94 está representada a projecção das 9 variáveis no plano definido pelos 1º e 2º componentes principais, mostrando a figura 3.95 a distribuição dos objectos segundo as mesmas componentes.

O gráfico da figura 3.95 mostra que os vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho* distribuem-se ao longo do 2º componente principal sendo por isso mais afectados pelo álcool benzílico, pelo 2-feniletanol e pelo (*E*)-hex-3-en-1-ol. Os vinhos da casta *Boal* diferenciam-se dos vinhos das restantes castas em função do 1º componente principal, com o (*Z*)-hex-3-en-1-ol e o (*E*)-hex-2-en-1-ol a contribuírem exclusivamente para este componente.

Verificou-se ainda que os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* encontram-se todos situados para valores negativos dos 1º e 2º componentes principais. O 2-metilpropan-1-ol é a única variável que afecta negativamente os dois componentes.

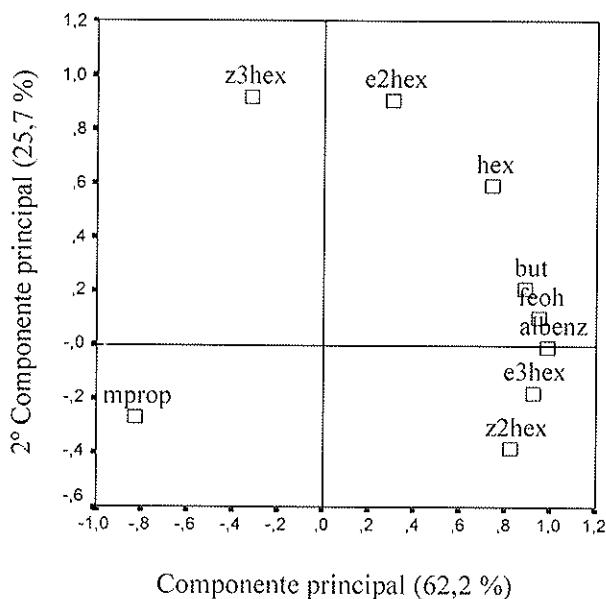


Figura 3.94 - Projecção bidimensional da influência das 9 variáveis nos 1º e 2º componentes principais, que representam 87,9 % da variância total do sistema.

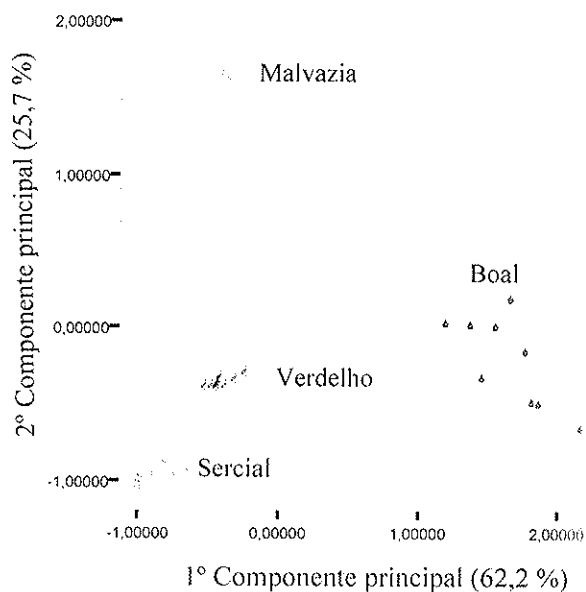


Figura 3.95 - Projecção bidimensional dos vinhos nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,9 % da variância total do sistema com 9 variáveis.

As variáveis álcool benzílico, 2-feniltanol e (*E*)-hex-3-en-1-ol, com influência positiva no 1º componente principal e negativa no 2º, estão associadas aos vinhos da casta *Malvazia*. A separação obtida sugere que os vinhos da casta *Boal* se distinguem dos vinhos das outras castas estudadas, em função das variáveis que apresentam valores positivos no 1º componente principal.

3.12.2 PCA aplicada aos ácidos gordos voláteis

À semelhança do que fizemos com os álcoois superiores, a selecção do conjunto de variáveis que melhor explicam a variabilidade entre os ácidos gordos voláteis dos vinhos das diferentes castas, conduz-nos a uma matriz (tabela 13. AB; pág 297) de apenas 6 variáveis (*MatrizÁcidosGordos*; 6×36). A análise de componentes principais aplicada a este conjunto de 6 ácidos gordos, originou a obtenção de dois componentes

principais que descrevem 85,8 % da variância total da amostra (tabela 3.32), sendo por isso uma boa representação da informação total implícita na análise.

Tabela 3.32 *Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos das castas estudadas com as 6 variáveis da Matriz Ácidos Gordos.*

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	3,4	51,9	51,9
2	1,8	33,9	85,8
3	0,5	7,8	93,6

O 1º componente explica 51,9 % da variância total, estando relacionado com o ácidos benzóico, octanóico e 2-hidroxibenzenopropanóico. Com uma contribuição inferior a estes surge o ácido hexanóico.

O 2º componente cuja contribuição mais significativa é dada pelos ácidos propanóico e 2-etil-hexanóico (figura 3.96), explica 33,9 % da variância total do conjunto inicial de dados.

A projecção bidimensional dos 36 vinhos monovarietais nos dois primeiros componentes principais (figura 3.97), mostra que é possível distinguir quatro grupos de vinhos com um posicionamento diferenciado.

A aplicação da *Anova* permite concluir, com um grau de confiança de 95 %, que os vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho* separam-se dos vinhos *Boal* e *Malvazia* em função do 1º componente principal. Existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios das 6 variáveis relativamente ao 2º componente principal.

Uma análise mais pormenorizada do gráfico da figura 3.97, revela que os vinhos da casta *Boal* se posicionam para valores negativos do 1º componente principal e positivos do 2º. Os ácidos octanóico e hexanóico são as variáveis que estão mais relacionadas com os vinhos desta casta.

Os vinhos da casta *Malvazia* são mais influenciados pelas variáveis que afectam positivamente os dois primeiros componentes principais, ou seja, pelos ácidos benzóico, 2-hidroxibenzenopropanóico e 2-etil-hexanóico.

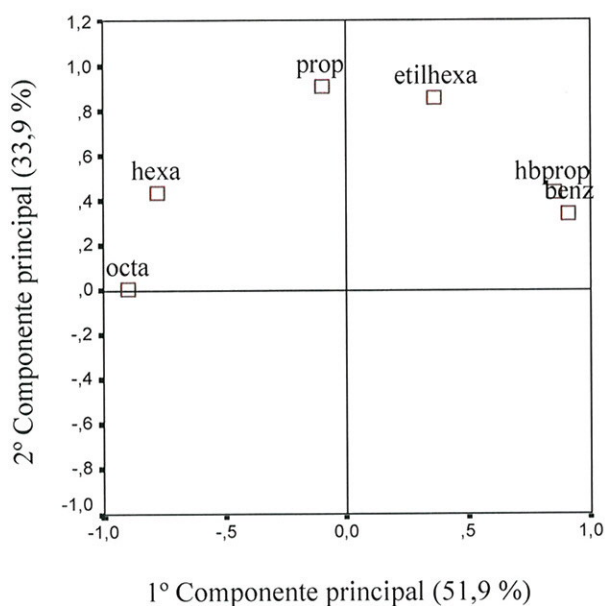


Figura 3.96 - Projecção tridimensional da influência das 6 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que explicam 85,8% da variância total do sistema.

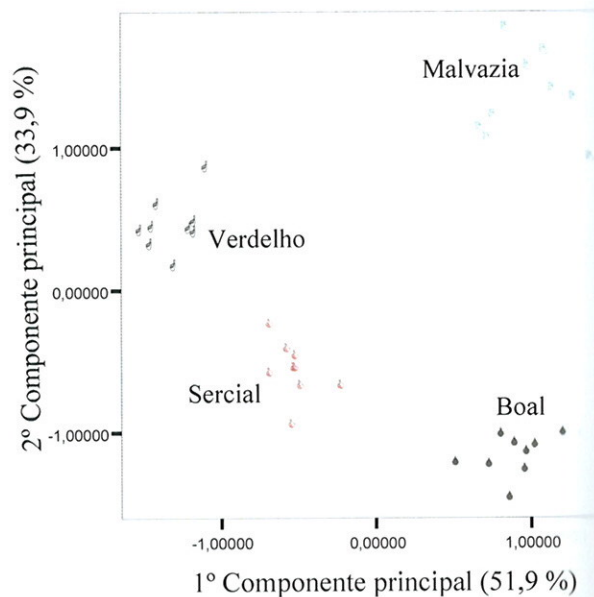


Figura 3.97 - Projecção bidimensional dos 36 vinhos das diferentes castas estudadas, nos planos definidos pelos dois primeiros componentes principais, representando 85,8% da variância total do sistema.

Relativamente aos vinhos das castas *Sercial* e *Verdelho*, os ácidos octanóico, hexanóico e propanóico, são os que mais contribuem para os primeiros. Para os segundos, as variáveis com peso positivo no 1º componente principal, os ácidos benzóico, 2-hidroxibenzenopropanóico e 2-etil-hexanóico, são as que mais lhes estão associadas.

3.12.3 PCA aplicada aos ésteres etílicos de ácidos gordos voláteis e ácidos fixos

Com o intuito de seleccionar o conjunto de variáveis que maximizem a percentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais foram

retiradas, passo a passo, o nonanoato de etilo, o benzoato de etilo e o lactato de etilo, das 13 variáveis que constituem a *MatrizÉsteres* (tabela 14. AB; pág. 298).

A análise de componentes principais aplicada aos 36 vinhos monovarietais efectuada com as 10 variáveis assim seleccionadas, originou a obtenção de dois componentes principais que explicam 91,0 % da variância total da amostra. 51,8 % desta variância são explicados pelo 1º componente principal, com o 2º componente a contribuir com 39,2 % (tabela 3.33).

Tabela 3.33 *Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos monovarietais com as 10 variáveis da MatrizÉsteres.*

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	5,2	51,8	51,8
2	3,9	39,2	91,0

A projecção bidimensional das 10 variáveis no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (figura 3.98), mostra que as variáveis com maior peso no 1º componente principal são o octadecanoato de metilo, o tetradecanoato de etilo, o benzenoacetato de etilo, o hexadecanoato de etilo, e em menor extensão o dodecanoato de etilo e o decanoato de etilo. 39,2 % da variância total são explicados pelo octanoato de etilo, pelo *cis*-9-decanoato de etilo e pelo hexanoato de etilo, variáveis relacionadas com o 2º componente principal (figura 3.99).

A separação conseguida através da projecção dos vinhos monovarietais das diferentes castas estudadas, de acordo com a casta de origem, nos dois primeiros componentes principais está representada na figura 3.99.

Verifica-se que, na generalidade, os vinhos das castas *Sercial* e *Malvazia*, se posicionam ao longo do 1º componente principal, contrariamente aos vinhos das castas *Boal* e *Verdelho* que são mais afectados pelas variáveis associadas ao 2º componente principal. O octadecanoato de etilo, o benzenoacetato de etilo, o hexadecanoato de etilo

e o succinato de dietilo, com pesos negativos no 2º componente principal são as variáveis que estão mais associadas aos vinhos da casta *Boal*.

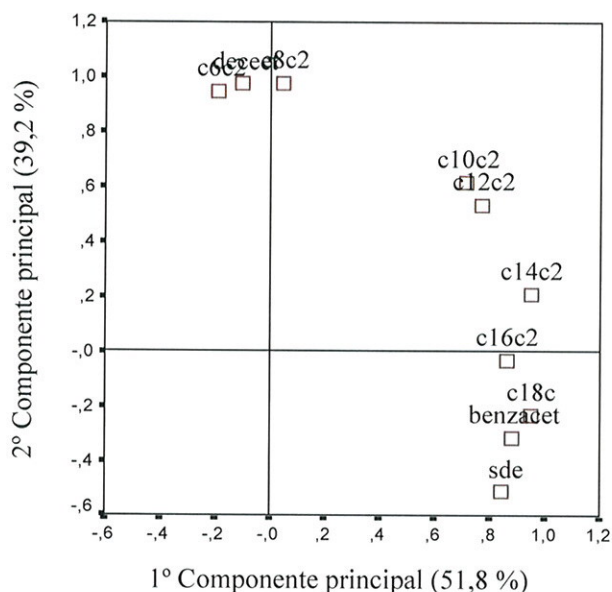


Figura 3.98 - Projecção bidimensional da influência das 10 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,0 % da variância total.

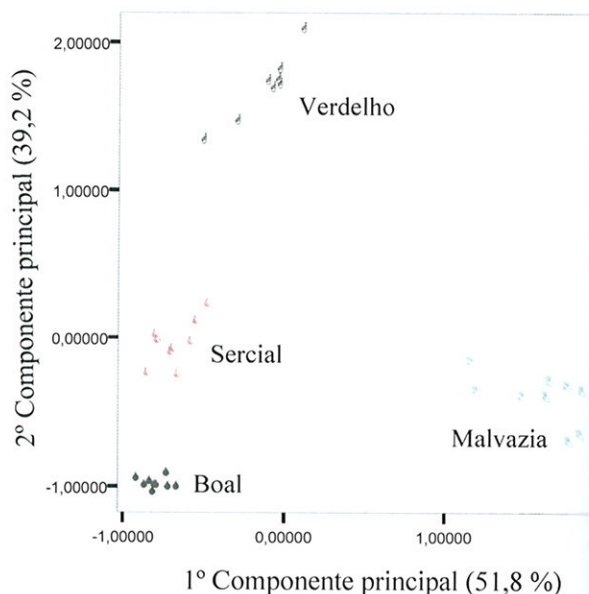


Figura 3.99 - Projecção bidimensional dos 36 vinhos nos dois primeiros componentes principais, que representam 91,0 % da variância total do sistema inicial.

Os vinhos da casta *Malvazia*, influenciados por valores negativos do 1º e positivos do 2º componente principal, são afectados, essencialmente, pelo *cis*-9-decenoato de etilo e pelo hexanoato de etilo.

Os ésteres, octadecanoato de etilo, benzenoacetato de etilo, hexadecanoato de etilo e succinato de dietilo estão relacionados com os vinhos *Sercial* por se situarem, na sua globalidade, para valores negativos do 2º componente principal. Relativamente aos vinhos *Verdelho*, posicionados para valores positivos do 1º componente principal são afectados, principalmente, pelo octadecanoato de etilo, pelo tetradecanoato de etilo e pelo benzenoacetato de etilo

3.12.4 PCA aplicada aos compostos carbonilados

A análise de componentes principais aplicada aos 36 vinhos monovarietais, efectuada com as 7 variáveis (*tabela 15. AB; pág. 299*) que melhor descrevem a variação existente no conjunto de dados dos compostos carbonilados, originou a obtenção de dois componentes principais que descrevem 87,1 % da variância total da amostra (*tabela 3.34*). Verifica-se que, apesar do 3º componente principal contribuir com um incremento de 10,2 % na explicação da variância total, apresenta um valor próprio inferior à unidade (0,7).

Tabela 3.34 Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos três primeiros componentes principais, obtidos para os vinhos estudados com as 7 variáveis da Matriz Compostos Carbonilados.

Componente principal	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	3,4	45,9	45,9
2	2,7	41,2	87,1
3	0,7	10,3	97,4

A figura 3.100 mostra que as variáveis com maior peso no 1º componente principal, e que descrevem 45,9 % da variância existente nos dados, são o 5-(etoximetil)furfural, a nonanona e o 5-(hidroximetil)furfural. 41,2 % da variância total são explicados pela γ -butirolactona, pelo furfural, e em menor extensão pelo benzaldeído e pela pantolactona, compostos relacionados com o 2º componente principal. A separação conseguida através da projecção dos vinhos consoante a casta de origem está representada na figura 3.101.

Verifica-se (figura 3.101) que os vinhos das castas *Malvazia* e *Sercial* estão englobados no mesmo grupo não sendo, por isso, possível a sua separação com as 7 variáveis consideradas. Este grupo é afectado principalmente pelas variáveis, 5-(hidroximetil)furfural e pantolactona, com pesos negativos no 2º componente principal.

A figura 3.101 mostra igualmente que os vinhos da casta *Boal* se posicionam ao longo do 2º componente principal (valores negativos). As variáveis que afectam negativamente este componente são o 5-(hidroximetil)furfural e a pantolactona.

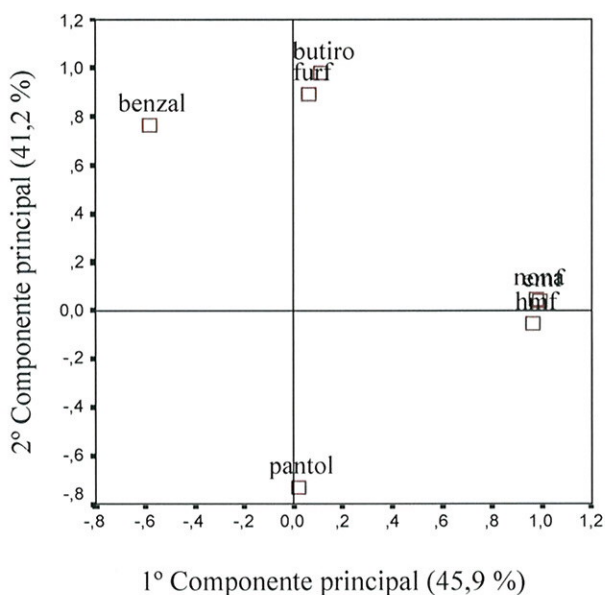


Figura 3.100 - Projecção bidimensional da influência das 7 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,1 % da variância total.

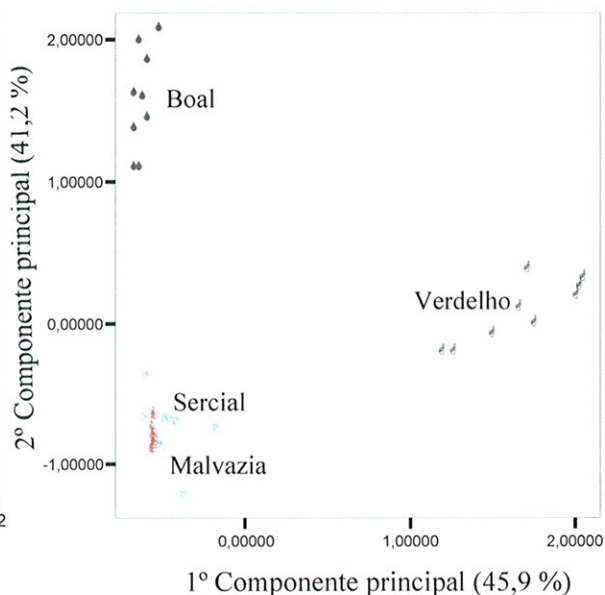


Figura 3.101 - Projecção bidimensional dos vinhos monovarietais nos dois primeiros componentes principais, que representam 87,1 % da variância total do sistema inicia.

Contrariamente aos vinhos *Boal*, os vinhos da casta *Verdelho* são mais afectados pelas variáveis associadas ao 1º componente principal - o 5-(etoximetil)furfural, a nonanona e o 5-(hidroximetil)furfural.

Dos grupos de compostos aos quais se aplicou a PCA, com excepção dos compostos carbonilados, que apesar da elevada percentagem explicada pelos dois primeiros componentes principais (87,1 %), não permitem a distinção entre os vinhos *Sercial* e *Malvazia*, todos os outros grupos de compostos permitiram uma separação nítida dos objectos, com maior importância para os ésteres etílicos de ácidos gordos e fixos (91,0 %) e para os terpenóis (89,9 %).

Apesar dos bons resultados, a sua importância poderá ser relativizada pelo reduzido número de objectos utilizado.

3.12.5 LDA APLICADA AOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS VINHOS MONOVARIETAIS

Com o intuito de encontrar funções discriminantes que permitissem classificar as castas, aplicou-se a LDA ao conjunto de variáveis que permitiram, dentro de cada grupo, explicar a máxima variância dos dados. Da aplicação da análise discriminante a este conjunto de variáveis, obteve-se as três funções discriminantes constantes na tabela 3.35.

Tabela 3.35 *Percentagem cumulativa da variância explicada por cada função canónica discriminante, resultante da aplicação da análise discriminante às 19 variáveis mais representativas dos vinhos Madeira estudados.*

Função discriminante	Valores próprios	Variância (%)	Percentagem Cumulativa	Correlação canónica	Wilks Lambda	χ^2	g.l.	Nível de Significância
1	3031,4	92,9	92,9	1,000	0,000	386,6	57	0,000
2	182,1	5,6	98,4	0,997	0,000	206,2	36	0,000
3	51,2	1,6	100	0,990	0,019	100,0	17	0,000

As duas primeiras funções discriminantes contribuem com 98,4 % da percentagem total para a discriminação. A 3ª função discriminante contribui com 1,6 % para a discriminação.

A 1ª função discriminante, à qual corresponde o maior poder discriminatório, é essencialmente influenciada pelo (*E*)-hex-3-en-1-ol, pelo succinato de dietilo e pelo *cis*-9-decenoato de etilo, enquanto que à 2ª função estão associadas o 5-(etoximetil)furfural, o octanoato de etilo, o ácido hexanóico, o hexanoato de etilo, o *cis*-9-decenoato de etilo, o α -terpineol, e em menor extensão, o tetradecanoato de etilo, o *trans*-óxido de linalol, o ácido propanóico e a pantololactona. Na 3ª função discriminante as variáveis que apresentam maior peso são o 2-feniletanol, o

benzaldeído, o ácido octanóico, o hexadecanoato de etilo, o benzenoacetato de etilo e o ácido 2-etil-hexanóico.

A figura 3.102 mostra que as duas primeiras funções discriminantes permitem encontrar uma separação nítida entre os indivíduos e os centróides pertencentes a grupos (objectos) diferentes, possibilitando deste modo, discriminar os vinhos estudados de acordo com a casta de origem.

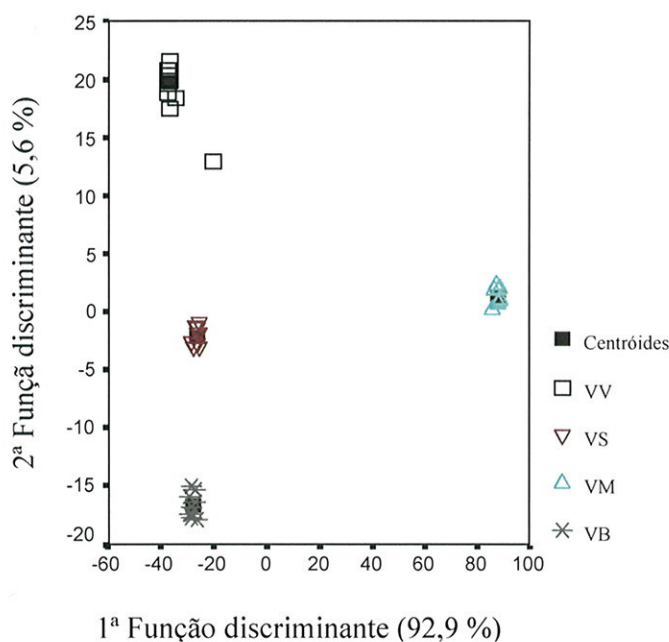


Figura 3.102 – Representação gráfica das duas primeiras funções discriminantes para os quatro grupos de vinhos, considerando as variáveis mais representativas.

Embora a análise discriminante tenha sido quase sempre destacada pelo seu poder analítico, é uma técnica da classificação importante, entendida como um processo de identificação do grupo mais provável a que um indivíduo pertence, sendo conhecidas as suas características através das variáveis discriminantes.

A capacidade de classificação das variáveis foi avaliada procedendo-se à análise discriminante de uma matriz com objectos não definidos em nenhum dos grupos.

Utilizando o critério de classificação de Fisher, segundo o qual um objecto deverá ser classificado num determinado grupo se estiver mais próximo da média deste do que da média dos restantes grupos, e de acordo com as funções discriminantes

obtidas, verificámos que todo os vinhos, não agrupados à *priori*, foram correctamente classificados, ou seja, 100 % dos casos (8/8).

A análise feita permite uma distinção clara entre os quatro grupos de vinho estudados.

Capítulo

4

Conclusões

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho visou a caracterização aromática (química) das uvas, mostos e dos vinhos monovarietais correspondentes das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*. Pretendeu-se ainda estudar a evolução de determinados compostos do vinho Madeira sujeitos a envelhecimento do tipo térmico/oxidativo. Numa primeira etapa, o estudo foi efectuado com 36 mostos das quatro castas nobres produtoras de vinho Madeira, e com os 36 vinhos monovarietais correspondentes. Numa segunda etapa o estudo foi alargado a 86 amostras de vinhos com idades compreendidas entre os 8 meses e 25 anos.

Desenvolveu-se uma metodologia analítica – HS-SPME/GC-MS, que permitiu a identificação de algumas dezenas de substâncias pertencentes a diferentes famílias químicas, nomeadamente: *monoterpenóis*, *norisoprenóides*, *álcoois superiores*, *ácidos gordos voláteis*, *ésteres etílicos de ácidos gordos*, *ésteres etílicos de ácidos fixos* e *compostos carbonilados*.

No estabelecimento do método analítico que constituiu a primeira parte do trabalho, adoptou-se a microextracção em fase sólida com espaço de cabeça, HS-SPME, para a extracção dos compostos, seguida de análise e identificação por GC-MS. O método mostrou-se mais adequado do que a extracção líquido-líquido com diclorometano na análise simultânea de terpenóis, norisoprenóides, acetatos de álcoois superiores e ésteres etílicos de ácidos gordos. Para os monoterpenóis, o limite de detecção foi em média de $1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a solução aquosa e $2,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a solução hidroalcoólica a 18%. A repetibilidade de 6 injecções variou de 2,3 % a 14,4 % para as soluções aquosas e 4,8 % a 14,2 % para as soluções hidroalcoólicas a 18 %. Para as amostras de mostos a repetibilidade variou de 0,4 % a 9,5 % e para as amostras de

vinhos de 1,9 % a 22,2 %. A exactidão avaliada através do cálculo da percentagem de recuperação, foi em média, de 83,2 % para os mostos e 71,3 % para os vinhos.

Os estudos efectuados permitiram retirar as conclusões que se seguem :

i) Os principais grupos de compostos aromáticos da fracção livre do aroma das uvas, excluindo o composto desconhecido [(-)-limoneno], são os aldeídos furânicos e compostos carbonilados, que representam, em média, 25,3 % e 24,4 % do total da fracção livre aromática, nas quatro castas de uvas estudadas. Os ácido gordos voláteis (15,9 %), os monoterpenos (12,1 %), os norisoprenóides (10,7 %) e os álcoois superiores (9,9 %), contribuem de forma menos significativa para a fracção livre aromática das uvas.

O composto desconhecido, mas com grande probabilidade de ser o (-)-limoneno, é o monoterpeno mais abundante em qualquer das castas de uvas analisadas. O nonanal e o (*E*)-hex-2-enal também apresentam áreas relativas significativamente mais elevadas que os outros compostos identificados.

As uvas da casta *Boal* apresentam teores de monoterpenóis, ácidos gordos voláteis e compostos carbonilados, superiores aos determinados nas uvas das outras castas. As uvas da casta *Sercial* são as mais ricas em aldeídos furânicos, enquanto que, os teores de monoterpenos e álcoois superiores são mais elevados nas uvas da casta *Verdelho*.

ii) Nos mostos das diferentes castas estudadas, os álcoois superiores são o grupo maioritário contribuindo com 56,4 % para a totalidade da fracção livre do aroma na casta *Boal*. Para os mostos das restantes castas a contribuição é de 51,2 %, 59,5 % e 49,6 %, respectivamente, para os mostos *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*. Os ácidos gordos voláteis com uma contribuição média de 15,7 % para a fracção livre total dos mostos das diferentes castas, constituem o segundo grupo mais abundante. Os ácidos hexanóico e octanóico são os mais representativos. Os ésteres etílicos de ácidos gordos e os monoterpenóis, representam 14,4 % e 10,2 %, respectivamente, para a fracção livre aromática dos mostos estudados.

iii) Os resultados obtidos na quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides livres, nos 36 mostos das castas *Boal*, *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, das vindimas de 1998, 1999 e 2000, permitiram concluir que os monoterpenóis mais abundantes são, em média, o farnesol, o linalol e o α -terpineol. Os mostos da casta *Malvazia* ($132 \mu\text{g.L}^{-1}$), são os mais ricos neste tipo de compostos contrariamente aos da casta *Sercial* ($63,3 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Os resultados permitiram igualmente concluir não haver diferenças estatisticamente significativas, ao nível quantitativo e qualitativo, entre os três anos estudados.

Este é o primeiro trabalho a fornecer valores acerca dos teores destes compostos nas diferentes variedades de vinhos Madeira, sendo original na aplicação da HS-SPME em vinhos licorosos com um teor alcoólico de, aproximadamente, 18 % (vol.).

iv) Foi possível distinguir os mostos das castas *Boal* e *Verdelho* dos mostos das castas *Malvazia* e *Sercial*, com base na relação acetato de 2-feniletilo/ β -damascenona. O valor médio desta razão é de 6,9 e 3,8 para os mostos das castas *Boal* e *Verdelho*, respectivamente, e de 0,5 e 0,3, para os mostos das castas *Malvazia* e *Sercial*. Similarmente, a abundância relativa dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol, pode ser utilizada para diferenciar os mostos das castas *Malvazia* e *Verdelho* dos mostos das castas *Boal* e *Sercial*. Com efeito, o valor médio do quociente (*Z*)/(*E*) foi de 25,0 para os mostos da casta *Malvazia* e de 3,9 para os mostos da casta *Verdelho*. Para os mostos das castas *Boal* e *Sercial*, o valor da razão foi de 0,9 e 0,8, respectivamente. Este facto deverá ser explorado futuramente com um maior número de amostras.

v) A aplicação da análise multivariável aos monoterpenóis e norisoprenóides, permitiu estabelecer relações entre os mostos das diferentes castas e os compostos que mais lhes estão associados. A interpretação dos resultados obtidos pela PCA permite afirmar que o nerol e o linalol, foram os terpenóis com maior peso nos mostos das castas *Boal* e *Verdelho*. O citronelol, a β -ionona e o geraniol, nos mostos da casta *Sercial*, e o citronelol e a β -ionona nos mostos da casta *Malvazia*,

foram as variáveis que mais contribuíram para a diferenciação entre os mostos das referidas castas.

vi) Dos diferentes grupos de compostos químicos identificados nos vinhos monovarietais, ao álcoois superiores são o grupo mais representativo em qualquer dos vinhos das diferentes castas estudadas (54,1 %). Com 28,5 %, os ésteres etílicos dos ácidos gordos são o segundo grupo mais abundante, seguindo-se os ácidos gordos voláteis (5,6 %) e os ésteres etílicos dos ácidos fixos (4,7 %).

Verificou-se que os álcoois superiores mais abundantes nos vinhos monovarietais estudados são o 2-metilbutan-1-ol, o 2-feniletanol e o hexan-1-ol, embora os seus teores nunca atinjam os respectivos limiares de percepção olfativo.

vii) Os resultados obtidos na quantificação dos monoterpenóis e norisoprenóides livres, nos 36 vinhos monovarietais das vindimas de 1998, 1999 e 2000, permitiram concluir que a casta *Malvazia* é a mais rica neste tipo de compostos contrariamente à casta *Sercial*. Os compostos de origem varietal mais abundantes nos vinhos das quatro castas estudadas são, o linalol, o α -terpineol e a β -damascenona.

Em qualquer dos vinhos das castas estudadas, os teores de β -damascenona são superiores ao seu limiar olfativo contribuindo, deste modo, para o aroma dos vinhos analisados.

Verificou-se também a não existência de diferenças estatisticamente significativas ao nível quantitativo e qualitativo entre os três anos estudados.

viii) Os vinhos da casta *Boal* são os mais ricos em norisoprenóides, álcoois superiores e compostos carbonilados. Por sua vez os vinhos da castas *Malvazia* apresentam teores de monoterpenóis superiores aos determinados para os vinhos das outras castas. Os ésteres etílicos de ácidos gordos e os fenóis voláteis são maioritários nos vinhos da casta *Sercial*. Os teores em acetatos de álcoois superiores, ácidos gordos voláteis e compostos furânicos, são mais abundantes nos vinhos da casta *Verdelho*.

ix) O acetato de etilo, o hexanoato de etilo e a β -damascenona contribuem, de forma marcante, para o carácter “frutado” e “floral” de qualquer dos vinhos das castas estudadas. O acetato de isoamilo (odor a banana) aparece em concentrações superiores ao limiar de percepção nos vinhos das castas *Malvazia*, *Sercial* e *Verdelho*, enquanto que, o octanoato de etilo nos vinhos da casta *Malvazia*, e o octanoato e decanoato de etilo nos vinhos da casta *Verdelho*, contribuem com nuances frutadas para o aroma dos vinhos Madeira jovens.

x) É possível diferenciar os vinhos das quatro castas através dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol. Verificou-se que a razão das concentrações dos isómeros é constante para cada casta, apresentando valores de cerca de 1,0 para a casta *Boal*, de 31,9 para a casta *Malvazia*, de 7,0 para a casta *Sercial* e de 3,9 para a casta *Verdelho*.

xi) A análise de componentes principais aplicada aos diferentes grupos de compostos aromáticos, permitiu concluir que, com excepção dos compostos carbonilados, todos os outros grupos permitem distinguir os vinhos monovarietais das diferentes castas.

As variáveis que mais contribuem para caracterizar os vinhos da casta *Boal* são: o farnesol, o TDN, o (*E*)-hex-3-en-1-ol, o (*E*)-hex-2-en-1-ol, os ácidos hexanóico e octanóico, o octadecanoato de etilo, o HMF e a pantolactona. Para os vinhos da casta *Malvazia* as variáveis mais importantes são: o α -terpineol, o nerolidol, o trans-óxido de linalol, o álcool benzílico, o 2-feniletanol, o (*E*)-hex-3-en-1-ol, o ácido benzóico, o hexanoato de etilo e o HMF. As variáveis nerolidol, 2-metilpropan-1-ol, ácido octanóico, octadecanoato de etilo e pantolactona, são as mais significativas na diferenciação dos vinhos da casta *Sercial* relativamente aos vinhos das outras castas. Para os vinhos da casta *Verdelho*, as variáveis com maior peso são o α -terpineol, 2-metilpropan-1-ol, o ácido benzóico e o 5-(etoximetil)furfural.

O pequeno número de amostras (9 de cada uma das castas estudadas) confere, no entanto, uma importância relativa à análise por componente principal efectuada, salvaguardando a necessidade de se realizar um estudo mais aprofundado com um maior número de amostras.

xii) No que se refere à evolução dos compostos ao longo do envelhecimento, observaram-se diferentes comportamentos consoante os compostos em causa. Genericamente, e considerando os vinhos das diferentes variedades, parece que os teores dos *álcoois superiores*, dos *acetatos de álcoois superiores*, dos *ácidos gordos voláteis*, dos *ésteres etílicos de ácidos fixos*, dos *compostos carbonilados*, dos *fenóis voláteis* e dos *aldeídos furânicos*, aumentam com o envelhecimento, enquanto que os teores dos *monoterpenóis*, dos *norisoprenóides* e dos *ésteres dos ácidos gordos*, apresentam um decréscimo.

De um modo geral, ao longo do envelhecimento do vinho os diferentes grupos de compostos apresentaram um comportamento coerente com o teoricamente previsto.

xiii) Os teores dos acetais identificados aumentam com o tempo de armazenamento. Os isómeros *cis/trans*- do 4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano e do 5-hidroxi-2-metil-1,3,-dioxano estão correlacionados de modo linear com o envelhecimento do vinho. Verificou-se ainda, que o equilíbrio termodinâmico entre o 5-hidroxi-2-metil-1,3,-dioxano e o 4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano estabelece-se ao fim de 10 anos e que a forma dioxano (70 %) prevalece sob a forma dioxolano (30 %).

No decurso do envelhecimento forma-se preferencialmente o 4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano, no entanto, devido à isomerização mútua entre cada estrutura, a forma cíclica mais estável, a 5-hidroxi-2-metil-1,3,-dioxano, é favorecida. Assim o isómero *cis*-5-hidroxi-2-metil-1,3,-dioxano é maioritário para vinhos com idades superiores a 3 anos.

xiv) Entre os compostos furânicos e pirânicos analisados, alguns estão relacionados com a duração do envelhecimento em casco de carvalho. Verificou-se um aumento aparentemente linear com o tempo de envelhecimento para o furfural, 5-metilfurfural, 5-(hidroximetil)furfural, 5-(acetoximetil)furfural e 5-(etoximetil)furfural.

xv) É notório o aroma a “especiarias” e a “noz” nos vinhos Madeira velhos. A pesquisa de compostos aromáticos responsáveis por este aroma conduziu à identificação do sotolon, composto associado aos descritores acima referidos.

Tendo em consideração a importância organoléptica deste composto no vinho Madeira, estudou-se a sua evolução no decurso do envelhecimento.

Verificou-se que os teores de sotolon, estão correlacionados com a idade dos vinhos analisados. Ausente nos vinhos com 8 meses, foi identificado nas amostras a partir dos 6 anos. Para os vinhos da casta *Boal* os teores médios atingem os $645,7 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para os vinhos das outras castas, as concentrações médias determinadas foram $862,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os vinhos da casta *Malvazia*, $216,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os vinhos da casta *Sercial* e $607,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os vinhos da casta *Verdelho*.

Pelo descrito, verificou-se que os compostos aromáticos mostraram-se úteis na discriminação dos vinhos monovarietais sendo por isso um instrumento importante na detecção de fraudes.

Por outro lado, espero que o estudo tenha contribuído para um conhecimento das características específicas dos vinhos Madeira, relativamente a outros, e que possa contribuir de algum modo para a melhoria da qualidade dos vinhos produzidos.

Perspectivas futuras

Se bem que a realização deste trabalho tenha permitido, pela primeira vez, obter informação relevante sobre a constituição aromática essencialmente dos mostos e dos vinhos das castas nobres produtoras de vinho Madeira, seria importante confirmar alguns resultados apresentados nomeadamente no que se refere às uvas, que foram estudadas apenas na vindima de 2000.

Sendo o primeiro trabalho do género realizado com vinhos Madeira, são inúmeras as possibilidades que se podem explorar. No meu ponto de vista, no entanto, acho que será importante aprofundar alguns pontos que passo a citar:

i) Proceder à realização de análise olfactivométrica (GC-O) de modo a procurar compostos chave do aroma dos vinhos das castas nobres, alargando o estudo a outras, nomeadamente à Tinta Negra Mole.

ii) Estudar a fracção glicosilada de modo a obter informação da percentagem de compostos que, em cada uma das castas, se encontra nesta forma para, se necessário, recorrer a tecnologias de vinificação que permitam melhorar as características organolépticas dos vinhos Madeira.

iii) Seguir a evolução dos constituintes das fracções livre e glicosilada do aroma das uvas, durante a maturação, e estudar a distribuição desses compostos nas diferentes partes constituintes do bago.

iv) Confirmar a possibilidade de distinguir os vinhos das quatro castas com base no teor dos isómeros (*E*) e (*Z*) do hex-3-en-1-ol.

v) Avaliar a influência do processo de *estufagem* e da *temperatura de estufagem* nas evoluções das características aromáticas.

vi) Alargar o estudo a outras famílias de compostos químicos, como por exemplo, compostos sulfurados e metoxipirazinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M.S.; Lacey, M.J. Methoxypyrazines of grapes and wines. *In: Chemistry of Wine Flavor*. ACS Symposium Series 714. **1999**, 31-38.
- Allen, M.S.; Lacey, M.J. Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate cultivar and vitivulture. *Wein Wissenschaft*. **1993**, 46, 211-213.
- Allen, M.S.; Lacey, M.J.; Boyd, S. Determination of methoxypyrazines in red wines by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1734-1738.
- Allen, M.S.; Lacey, M.J.; Harris, R.L.N.; Brown, W.V. Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon Blanc wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42, 109-112.
- Alvarez, I.; Casp, A.; Zunica, L.; Alexandre, J.L.; Garcia, M.J. Application de méthodes d'analyses multidimensionnelles à la différenciation des vins blancs Espagnols d'appellation d'origine. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1997**, 31, 99-107.
- Alves, M.A. Caracterização química de 4 castas produtoras de vinho do Porto durante a maturação. Estudo dos açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos livres. *Tese de Doutorado*. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. **1992**.
- Amerine, M.A.; Pangborn, R.M.; Roessler, E.B. Principles of sensory evaluation of food. *Academic Press*, N.Y. **1965**.
- Anness, B.J.; Bamforth, C.W. The role of dimethyl sulphoxide reductase in the formation of dimethyl sulphide during fermentation. *J. Inst. Brew.* **1981**, 87, 30-34.
- Anocibar, B.; Bertrand, A. Study on sulphur compounds in wine: preliminary results. *Ital. J. Food Sci.* **1995**, 3, 279-289.
- Antonelli, A.; Castellari, L.; Zambonelli, C.; Carnacini, A. Yeast influence on volatile composition of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1139-1144.
- Arrhenius, S.P.; McCloskey, L.; Sylvan, M. Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1085.
- Arthur, C.L.; Killam, L.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J. Automation and optimisation of solid phase microextraction. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1960.

- Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
- Aubert, C. Baumes, R.L.; Günata, Y.Z.; Lepoutre, J.P.; Cooper, J.F.; Bayonove, C.L.L. Effects of fluzilazole, a sterol biosynthesis inhibitor fungicide, on the free and bound aroma fraction of Muscat of Alexandria wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1997**, *31*, 57-67.
- Aznar, M.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *48*, 2224-2929.
- Aznar, M.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least square regression models. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2700-2707.
- Baker, G.; Wong, J.T.F.; Pasutto, F.M. Simultaneous extraction and quantification of several biogenic amines in cheese and chocolate. *J. Chromatogr.* **1987**, *392*, 317-331.
- Bamforth, C.W.; Anness, B.J. Dimethyl sulphide – a review. *J. Inst. Brew.* **1982**, *88*, 244-252.
- Bao, M.; Griffini, O.; Burrini, D.; Santianni, D.; Barbieri, K.; Mascini, M. Headspace solid-phase microextraction for the determination of trace levels of taste and odor compounds in water samples. *Analyst.* **1999**, *124*, 459-466.
- Barillère, J.M.; Samson, A.; Bayonove, C.L.; Bouvier, J.C. Analyses multidimensionnelles sur les caractéristiques chimiques et organoleptiques des vins blancs obtenus par macération pelliculaire. *Rev. Fr. Oenol.* **1990**, *123*, 3-11.
- Baro, A.L.; Quiros, C.J.A. Les conditions de formation des aldehydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phénomènes d'oxydation et les caractéristiques organoleptiques. *Bull. O.I.V.* **1977**, *50*, 253-267.
- Baumes, R.; Bayonove, C.L.; Barillere, J.M.; Samson, A.; Cordonnier, R.E. La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des vins. *Vitis.* **1988**, *28*, 31-48.
- Baumes, R.; Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E.; Torres, P.; Seguin, A. Incidence de la macération pelliculaire sur la composante aromatique des vins doux naturels de Muscat. *Rev. Fr. Oenol.* **1989**, *116*, 6-11.
- Baumes, R.; Bayonove, C.L.; Günata, Y.Z. Connaissances actuelles sur le potentiel aromatique des muscats. *Prog. Agric. Vitic.* **1994**, *111*, 251-256.
- Baumes, R.; Cordonnier, R.E.; Nitz, S.; Drawert, F. Identification and determination of volatile constituents in wines from different wine cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *37*, 927-934.

- Bauza, T.; Blaise, A.; Daumas, F.; Cabanis, J. determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallé du Rhône by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* **1995**, *707*, 373-379.
- Bayonove, C.L. Les composés terpéniques. *In: Acquisition Récents en Chromatographie du Vin. Application à l'Analyse Sensorielle des Vins.* Porto, Abril. **1992**, 99-119.
- Bayonove, C.L. Les composés terpéniques. *In: Les Acquisition Récents en Chromatographie du Vin. Applications à l'analyse sensorielle des vins.* **1993**. Tec. Doc. Lavoisier, Paris. 99-119.
- Bayonove, C.L.; Baumes, R.; Crouzet, J.; Günata, Z. Arômes. *In: Oenologie – Fondements Scientifiques et Technologiques.* **1998**, Cap. N°5, Lavoisier Tec & Doc, Paris. 163-235.
- Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E. Recherches sur l'arôme du Muscat III. Étude de la fraction terpénique. *Ann. Technol. Agric.* **1971**, *20*, 347-355.
- Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E.; Bénard, P.; Ratier, R. L'extraction des composés de l'arôme du Muscat dans la phase préfermentaire de la vinification. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **1976**, *62*, 734-750.
- Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E.; Dubois, P. Étude d'une fraction caractéristique de l'arôme de raisin de la variété Cabernet-Sauvignon; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sc. Paris. Serie D (t.281).* **1974**, 75-78.
- Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E.; Ratier, R. Localisation de l'arôme dans la baie de raisin: variété Muscat d'Alexandrie et Cagernet-Sauvignon. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **1974a**, *60*, 1321-1328.
- Bayonove, C.L.; Günata, Y.Z.; Baumes, R.; Dugelay, I.; Grassin, C. Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rev. Oenologues.* **1992**, *18*, 15-18.
- Bayonove, C.L.; Günata, Y.Z.; Dugelay, I.; Baumes, R.; Razungles, A.; Sapis, J. C. Le potentiel aromatique du raisin et son évolution dans le vin: quelques exemples caractéristiques. *In: Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins.* **1993**. (Actes du Symposium International) Montpellier, France. 2-11.
- Bayonove, C.L.; Günata, Y.Z.; Dugelay, J.; Razungles, A.; Sapis, J. C. *In "Connaissance aromatique des cépages et qualité du vin" Actes du Symposium International, Rev. Fr. d'Oenol. (Ed.),* 2-9, Montpellier. **1995**.

- Bell, A.A.; Ough, C.S.; Kliever, V.M. Effects of must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seeds grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 124-139.
- Bencomo-Rodríguez, J.J.; Conde, J.E.; Rodríguez-Delgado, M.A.; García-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J.P. Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *963*, 213-223.
- Bencomo-Rodríguez, J.J.; Conde, J.E.; Rodríguez-Delgado, M.A.; García-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J.P. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002a**, *991*, 13-22.
- Bertrand, A. Ceppi di lievito e loro sviluppo in relazione agli aromi e alla stabilità dei vini. *Vini d'Italia*, **1989**, 23-73.
- Bertrand, A. Influence du débourage et de la température de fermentation sur les teneurs en substances volatiles des vins blancs. *Ann. Technol. Agric.* **1978**, *27*, 231-233.
- Bertrand, A.; Torres-Alegre, V. Incidence de l'action de l'oxygène sur la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Sci. Aliments.* **1984**, *4*, 45-64.
- Bertrand, A.; Zmirou-Bonnamour, C.; Lonvaud-Funel, A. Aroma compounds formed in malolactic fermentation. In: *Flavor research of alcoholic beverages. Instrumental and sensory analysis*. Foundation for Biotechnical & Industrial Fermentation Research, L. Nykänen and P. Lehton (Eds.), June 13-15 Helsinki, Finland. **1984**, 39-49.
- Bertuccioli, M.; Vianni, R. Red wine aroma: identification of headspace constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1976**, *27*, 1035-1038.
- Bidan, P. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées en particulier en acides aminés. *Bulletin de l'O.I.V.* **1975**, *536*, 842-865.
- Bisson, L.F.; Butzke, C.E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 168-177.
- Bisson, L.F.; Danley, B.; Bertrand, A. Influence of fermentation temperature on composition of dry white wine. *Conn. Vigne Vin.* **1980**, *14*, 195-202.
- Blanch, G. P.; Reglero, G.; Herraiz, M. Analysis of wine aroma by off-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1251-1258.

- Blank, I.; Fay, L. B. Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through Maillard reaction based on pentose sugars. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 531-536.
- Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, J.; Croteau, R. Plant terpenoid synthesis: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4126-4133.
- Boubals, D. L'aspect variétal de l'arôme des vins. *Le Progrès Agricole et Viticole*. **1977**, *24*, 678-685.
- Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. *Principles and Practices of Winemaking*. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. **1998**.
- Brás, I.; Santos, L.; Alves, A. Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas-chromatography-electron-capture detection after solid-phase microextraction. *J. Chromatogr.* **2000**, *891*, 305-311.
- Brock, M.L.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Comparison of volatiles in a Palomino wine and a submerged culture flor sherry. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 151-155.
- Cabrera, M.J.; Moreno, J.; Ortega, J.M.; Medina, M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpene by five yeast strains in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 283-287.
- Caldeira, I.; Belchior, A.P.; Clímaco, M.C.; Bruno de Sousa, R. Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Anal. Chimica Acta.* **2002**, *458*, 55-62.
- Câmara, J.S.; Alves, M.A.; Marques, J.C. *Advances in Mass Spectrometry*. **2001**, *15*, 943.
- Câmara, J.S.; Alves, M.A.; Marques, J.C. *to be published*.
- Câmara, J.S.; Herbert, P.; Marques, J.C.; Alves, M.A. Varietal aroma compounds of grape varieties producing Madeira wines. *In: 3th Symposium In Vino Analytica Scientia*. **2003a**. Aveiro, Portugal.
- Câmara, J.S.; Marques, J.C.; Alves, M.A.; Silva Ferreira, A.C. Heterocyclic acetals in Madeira wines. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 1221-1224.
- Cantagrel, R.; Carles, J. *Ann. Nutr. Aliment.* **1978**, *32*, 1073-1094.
- Castagnino, C.; Cheze, C.; Vercauteren, J. New glycosylated polyphenols from red wines. *In: In Vino Analytica Scientia*. **1997**, 114-117.
- Castino, M. Connaissance de la composition du raisin et du vin. Passage au vin des substances non transformés par la fermentation. Apparition dans le vin des substances nées lors de la fermentation. *Bulletin de l'O.I.V.* **1988**, *689-690*, 539-553.
- Cerutti, G.; Gelati, R.; Zappavigna, R. Fermentazione del mosto d'uva in presenza di aminoacidi. *Riv. Vitic. Enol. Conegl.* **1978**, *31*, 249-257.

- Chappell, J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 1-6.
- Charles, M.; Martin, B.; Ginies, C.; Etiévant, P.; Coste, G.; Guichard, E. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 70-77.
- Charpentier, C.; Pham, T.T.; Guichard, E.; Arbault, B. Production du sotolon par les levures isolées des vin jaunes du Jura. In: *Lonvaud-Funel A 5^e Symp. Int. Oenol.*, Bordeaux, Lavoisier, Tec-Doc, Paris. **1995**, 179-182.
- Chatonnet, P.; Boidron, J.N. Dosages des phénols volatiles dans les vins par chromatographies en phase gazeuse. *Sci. Aliments.* **1988**, *8*, 479.
- Chatonnet, P.; Boidron, J.N.; Pons, M. Élevage des vins rouge en fût de chêne: évolution de certains composés volatiles et de leur impact aromatique. *Sci. Aliments.* **1990**, *10*, 565-587.
- Chatonnet, P.; Dubourdiou, D.; Boidron, J.N. Le caractère phenolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fr. Oenol.* **1992**, *138*, 21-24.
- Chatonnet, P.; Dubourdiou, D.; Boidron, J.N.; Lavigne, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 191-202.
- Chatonnet, P.; Dubourdiou, D.; Boidron, J.N.; Pons, M. The origine of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992a**, *60*, 165-178.
- Chatonnet, P.; Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. *Thèse de Doctorat (n° 338) de l'Universite Vitor Segalen Bordeaux 2.* **1995**.
- Chen, E.C.H. The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *Am. J. Soc. Brew. Chem.* **1978**, *36*, 39-43.
- Chevance, F.; Guyot-Declerck, C.; Dupont, J.; Collin S. Investigation of the β -damascenone level in fresh and aged commercial beers. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3818-3821.
- Chisholm, M.G.; Guiher, L.A.; Zaczek, S. Aroma characteristics of aged Vidal blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 56-62.
- Clímaco, C. Efeitos do envelhecimento na composição aromática e na qualidade dos vinhos tintos. *Provas de Acesso à Categoria de Investigador Auxiliar.* **1987**.
- Cocito, C.; Gaetano, G.; Delfini, C. Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chem.* **1995**, *52*, 311-320.
- Cordonnier, R.E. Mécanismes et facteurs de formation de composés à flaveurs herbacées. *Rev. Œnologues.* **1989**, *53S*, 25-27.

- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liée révélabes par une ou plusieurs enzymes du raisin. *C. R. Acad. Sci.* **1974**, 278, 3387-3390.
- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L. Étude de la phase prefermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas de terpenols, des aldéhydes et des alcools en C₆. *Conn. Vigne et Vin.* **1981**, 4, 269-286.
- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L. Les composants variétales et préfermentaires de l'arôme des vins. *Rev. Fr. d'Oenol.* **1979**, 16, 79-90.
- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L.; Baumes, R. Données récentes sur les précurseurs d'arôme du raisin; perspectives de leur exploitation en œnologie. *Rev. Fr. d'Oenol.* **1986**, 102, 29-41.
- Correia, M.; Delerue-Matos, C.; Alves, M.A. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *J. Chromatogr.* **2000**, 889, 59-67.
- Crouzet, J. Les enzymes et l'arôme des vins. *Rev. Fr. d'Oenol.* **1986**, 102, 42-49.
- Crouzet, J.; Flanzly, C.; Günata, Y.Z.; Pellerin, P.; Sapis, J.C. Les enzymes en œnologie. In: *Œnologie – Fondements Scientifiques et Technologiques*, Cap. n°10, Lavoisier Tec & Doc, Paris. **1998**, 361-411.
- Curvelo-Garcia A.S. *Controlo da Qualidade dos Vinhos: Química Enológica – Métodos Analíticos*. Instituto do Vinho e da Vinha. **1988**.
- Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Dubourdieu, D. Influence of storage on the formation of some volatile compounds in white fortified wines (vins doux naturels) during the aging process. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2340-2345.
- Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Étude sur l'arôme des vins doux naturels non Muscatés. 1^{ère} Partie: Analyse qualitative de l'arôme des Banyuls et Rivesaltes au cours de leur vieillissement. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1998**, 32, 99-110.
- Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Identifying new volatile compounds in toasted oak. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1663-1667.
- Darriet, P.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage chromatographie en phase gazeuse-odometrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1991**, 25, 167-174.
- Darriet, P.; Tominaga T.; Demole E.; Dubourdieu D. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* var. Sauvignon d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-ona. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **1993**, 316, 1332-1335.

- De Mora, S.J.; Eschenbruch, R.; Knowless, S.J. The formation of dimethyl sulphide during fermentation using wine yeast. *Food Microbiol.* **1986**, *3*, 27-32.
- De Mora, S.J.; Eschenbruch, R.; Knowless, S.J.; Torrey, W.J. Dimethyl sulphide in Australian red wines. *Vitis*. **1987**, *26*, 79-84.
- Delcroix, A.; Günata, Y.Z.; Sapis, J.C.; Salmon, J.M.; Bayonove, C.L. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect of terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 291-296.
- Di Stefano, R. Composti terpenici del moscato bianco del Piemonte. *Vini d'Italia*, **1981**, *23*, 29.
- Di Stefano, R. Evoluzione dei composti terpenici liberi e glucisidici e degli actinidioli durante la conservazione dei mosti e dei vini in funzione del pH. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano*. **1989**, *42*, 11-23.
- Di Stefano, R.; Ciolfi, G.; Delfini, C. Composti volatili prodotti dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.* **1981**, *2*, 11-23.
- Di Stefano, R.; Maggiorotto G.; Gianotti S. Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano*. **1992**, 43-49.
- Dimitriadis E; Williams P.J. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 66-71.
- Drob, A.; Wittkowski, R. Biogenic amines in wine. *O.I.V., Feuillet blue n°37*. **1993**.
- Dubois, P. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fr. d'Enol.* **1993**, *144*, 63-72.
- Dubois, P. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fr. d'Enol.* **1994**, *145*, 27-40.
- Dubois, P. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fr. d'Enol.* **1994a**, *146*, 39-50.
- Dubois, P. Volatile phenols in wines. In: *Flavour Distilled Beverages*. Piggot J.R. Ed., Soc. Chem. Ind., London. **1983**
- Dubourdieu, D. Wine technology: current trends. *Experientia*. **1986**, *42*, 914-921.
- Dugay, J.; Miège, C. Hennion, M.C. Effect of various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. *J. Chromatogr.* **1998**, *795*, 27-42.
- Dugelay, I. L'arôme du raisin: étude des précurseurs hétérosidiques et des activités enzymatiques exogènes impliquées dans leur hydrolyse; applications technologiques. *Thèse École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier*. **1993**.
- Dugelay, I.; Baumes, R.; Günata, Y.Z.; Razungles, A.; Bayonove, C.L. Évolution de l'arôme au cours de la conservation du vin : formation de 4-(1-éthoxyéthyl)-phénol et 4-(1-éthoxyéthyl)-gaïacol. *Sci. Aliments*. **1995**, *15*, 423-433.

- Dugelay, I.; Günata, Y.Z.; Sapis, J.C.; Baumes, R.; Bayonove, C.L. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2092-2096.
- Dugelay, I.; Günata, Y.Z.; Sapis, J.C.; Bayonove, C.L. Étude de l'origine du citronelool dans le vins. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1992**, *26*, 177-184.
- Dupin I.; Günata Y.Z.; Sapis J.C.; Bayonove C. Production of β -apiosidase by *Aspergillus niger*. Partial purification, properties, and effect on terpenyl apiosylglucosides from grape. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1886-1891.
- Eisert, R. Pawliszyn, J. New trends in solid-phase microextraction. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1997**, *27*, 103-135.
- Engel, K.H.; Heidlas, J.; Albrecht, W.; Tressel, R. Biosynthesis of flavor and aroma compounds in plants and microorganisms. In: *Flavor Chemistry: trends and developments*. Terranishi, R.; Buttery, R.G.; Shahidi, F., (Eds.), American Chemical Society; New York, Symposium series (388). **1989**, 8-22.
- Enzell, C. Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds. *Pure & Appl. Chem.* **1985**, *57*, 693-700.
- Etiévant, P.X. Constituants volatiles du vin jaunes: identification d'acetals dérivés du glycérol. *Lebensm. Wiss Technol.* **1979**, *12*, 115-120.
- Etiévant, P.X. Mise au point sur les techniques d'extraction et de separation des constituants volatiles du vin. *Conn. Vigne Vin.* **1987**, *21*, 247-265.
- Etiévant, P.X. Wine. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Cap. n° 14, Henk Maarse (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, **1991**, 483-546.
- Etiévant, P.X.; Issanchou, S.N.; Bayonove, C.L. The flavour of Muscat wine: the sensory contribution of some volatiles compounds. *J. Sci Food Agric.* **1983**, *34*, 497-504.
- Etiévant, P.X.; Schlich, P.; Symonds, P.; Bertrand, A. Varietal and geographic of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *45*, 25-41.
- Fagan G.L.; Kepner R.E.; Webb A.D. Production of linalol, cis- and trans-nerolidol, and trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on a simulated wine. *Vitis.* **1981**, *20*, 36-42.
- Falqué, E.; Fernández, E.; Dubourdieu, D. Volatile components of Loureira, Dona Branca, and Treixadura wines. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 538-543.

- Falqué-Lopez, E.; Darriet, P.; Fernández-Gómez, E.; Dubourdiou, D. Maceración y compuestos terpénicos en vinos Albariño. In: *Congresso Internacional de la Viticultura Atlántica*. La Toja-Pontevedra, Eapaña. **1994**, 489-498.
- Fazzalari F.A. *Compilation of Odor and taste Threshold Values Data*. Edited by F.A. Fazzalari, ASTM Data Series DS48A, Phidadelphia, Pa. **1978**.
- Fernández, I.O.; Camacho, F.M. Elaboración de vino Albariño. Incidencia de la maceración peculiar. Experiencias de 1989 e 1990. *Vitivinicultura*. **1992**, 3, 41-45.
- Ferreira V.; López, R.; Cacho, J.F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric*. **2000**, 80, 1659-1667.
- Ferreira V.; López, R.; Escudero, A.; Cacho, J. Quantitative determination of trace and ultratrace active compounds in red wines through gas chromatography-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *J. Chromatogr*. **1998**, 806, 349-354.
- Ferreira V.; López, R.; Escudero, A.; Cacho, J. The aroma of Grenache red wine: hierarchy and nature of its main odorants. *J. Sci. Food Agric*. **1998**, 77, 259-267.
- Ferreira V.; Ortín, N.; Escudero, A.; López, R.; Cacho, J. Chemical characterization of the aroma of Grenache Rosé wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, 50, 4048-4054.
- Ferreira V.; Rapp, A.; Cacho, J.F.; Hastrich, H.; Yavas, I. Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113. *J. Agric. Food Chem*. **1993**, 41, 1413-1420.
- Ferreira, B.; Hory, C.; Bard, M.H.; Taisant, C.; Olsson, A; Le Fur, Y. Effects of skin contact and settling on the level of the C18:3, C18:2 fatty acids and C₆ compounds in burgundy Chardonnay musts and wines. *Food Quality and preference*. **1995**, 6, 35-41.
- Francis I.L.; Sefton M.A.; Williams P.J. The sensory effects of pre- or post-fermentation thermal processing on Chardonnay and Semillon wines. *Am. J. Enol. Vitic*. **1994**, 45, 243-251.
- Freitas, A.; Câmara, J.S.; Aguiar, A.; Bastos, M.; Marques, J.C. Free volatile compounds found in grape skin with potential interference in the *Lobesia Botrana* behaviour. In: *3th Symposium In Vino Analytica Scientia*. **2003**. Aveiro, Portugal.
- Freitas, V. A. P.; Ramalho, P. S.; Azevedo, Z.; Macedo, A. Identification of some volatile descriptors of the rock-rose-like aroma of fortified red wines from Douro demarcated region. *J. Agric. Food Chem*. **1999**, 47, 4327-4331.

- Garcia, De la Calle; Magnaghi, S.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1996**, *19*, 257-262.
- Garcia, De la Calle; Magnaghi, S.; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Weber, J.; Bartzsch, C.; Feller, K.H. Improvement of the chemometric variety characterization of wines by improving the detection limit for aroma compounds. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1999**, *22*, 322-326.
- Garcia, De la Calle; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Bartzsch, C.; Feller, K-H. Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998a**, *21*, 373-377.
- Garcia, De la Calle; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Bartzsch, C.; Feller, K-H. Use of solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998b**, *360*, 784-787.
- García-Jares, C.M.; García-Martin, M.S.; Carro-Mariño, N.; Cela-Torrijos, R. GC-MS identification of volatile components of Galician (Northwestern Spain) white wines. Application to differentiate Rias Baixas wines from wines produced in nearby geographical regions. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *69*, 175-184.
- Gomez, E.; Martinez, A.; Laecina, J. Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties. *Vitis.* **1994**, *33*, 1-4.
- Goniak, O.; Noble, A. Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 223-227.
- Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst.* **1999**, *124*, 643-649.
- Gramatica, P.; Ranzi, B.M.; Manitto, P.; Potenza, O.I. Étude sur les spécificités de réactions enzymatiques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Décarboxylation d'acides cinnamiques et réduction d'alcools cinnamiliques. *Groupe Polyphenols.* **1978**, *8*, 117-120.
- Guedes de Pinho, P. Caractérisation des vins de la région de Vinhos Verdes au Portugal. Reconnaissance chimique et sensorielle des vins de cépages blancs non *Vitis vinifera*. *Thèse de Doctorat (n° 308) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2.* **1994**.
- Guichard, E.; Pham, T.; Charpentier, C. Le sotolon, marqueur de la typicité de l'arôme des vins du Jura. *Rev. Œnologues.* **1997**, *82*, 32-34.

- Guidici, P.; Zambonelli, C.; Kunkee, R. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 17-21.
- Günata, Y.Z. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin: importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, Université Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. **1984**.
- Günata, Y.Z., Bayonove, C.L.; Baumes, R.; Cordonnier, R.E. The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* **1985**, *331*, 83-90.
- Günata, Y.Z.; Bayonove, C.L.; Baumes, R.; Cordonnier, R.E. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1985a**, *36*, 857-862.
- Günata, Y.Z.; Bitteur, S.M.; Brillouet, J.M.; Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research.* **1998**, *184*, 139-149.
- Günata, Y.Z.; Blondeel C.; Vallier M.J. Lepoutre J.P.; Sapis J.C. An endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolysing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1998a**, *46*, 2748-2743.
- Guth, H. Comparison of different white wine varieties in odor profiles by instrumental analysis and sensory studies. *In: Chemistry of Wine Flavor*. ACS Symposium Series 714. **1999**, 39-52.
- Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3022-3026.
- Guymon, J.F.; Ingraham, J.L.; Crowell, E.A. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1961**, *12*, 60-66.
- Hardy, P.J. Extraction and concentration of volatiles from diluted aqueous and aqueous-alcoholic solutions using trichlorofluormethane. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 656-659.
- Henschke P.A.; Jiranek V. Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. *In: Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.), Chapter 4, Harwood Academic Publishers, Switzerland. **1994**, 77-164.
- Hernández-Orte, P.; Guitart, A.; Cacho, J. Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the *Denomination d'Origine* Somontano (Spain). *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 144-154.

- Herraiz, J.; Ough, C.S. Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 41-48.
- Heyman, H.; Noble, A.C.; Boulton, R. Analysis of methoxypyrazines in wines. 1. Development of a quantitative procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 268-271.
- Hofman, T.; Schieberle, P. Identification of potent aroma compounds thermally treated mixtures of glucose/cysteine and rhamnose/cysteine using aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 898-906.
- Houtman, A.C.; Du Plessis, C.S. Influence du cépage et de la souche de levure sur la vitesse et sur la concentration des composants volatils du vin. *Bulletin de l'O.I.V.* **1985**, *648-649*, 235-245.
- Jelen, H.H.; Wlazly, K.; Wasowicz, E.; Kaminski, E. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1469-1473.
- Jia, M.; Zhang, Q. H.; Min, D. B. Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2744-2747.
- Joslin, W.S.; Ough, C.S. Cause and fate of certain C₆ compounds formed enzymatically in macerated grape leaves during harvest and wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1978**, *29*, 11-17.
- Killian E.; Ough C.S. Fermentation esters – formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 301-305.
- Kinzer, G.; Schreier, P. Influence of different pressing systems on the composition of volatile constituents in unfermented grape musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1980**, *31*, 7-13.
- Kotseridis, Y.; Baumes, R. Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 400-406.
- Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Bertrand, A.; Skouroumounis, G.K. Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *J. Chromatogr.* **1999**, *841*, 229-237.
- Kwan, W-O.; Kowalski, B.R. Pattern recognition analysis of gas chromatographic data. Geographic classification of wines of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir from France and the United States. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 356-359.
- Lacey M.J.; Allen M.S.; Harris R.L.N.; Brown W.V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 103-108.

- Le Chevanton, L. Libération enzymatiques des arômes variétaux du raisin dans le vin. *In: Libération des arômes du raisin par voie enzymatique*. Gist-Brocades, France. **1993**.
- Lecanu, L.; Ducruet, V.; Jouquand, C.; Gratadoux, J.J.; Feigenbaum, A. Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface ripened cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3810-3817.
- Lehninger, A.L. Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. Worth, New York. **1970**.
- Lepe, J.S. Aromas de fermentación, defectos olfativos y metabolismo microbiano. *XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino. 75ª Asamblea General de la O.I.V.* Uruguay, **1995**, 95-120.
- Lhuguenot, L.C.; Ude, L.; Dymarsky, E.; Baron, C. *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1979**, *72*, 275-286.
- López, R.; Aznar, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. Quantitative determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* **2002**, *966*, 166-177.
- López, R.; Ferreira, V.; Hernández, P.; Cacho, J. Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1461-1467.
- López, R.; Ortín, N.; Pérez-Trujillo, J.P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Impact odorants of different young white wines from Canary Islands *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3419-3425.
- López-Tamames, E.; Carro-Mariño, N.; Günata, Y.Z.; Sapis, C.; Baumes, R.; Bayonove, C. Potential aroma in several varieties of Spanish grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1729-1735.
- Maarse, H.; Visscher, C.A. Volatile compounds in alcoholic beverages. Qualitative and quantitative data. TNO-CIVO *Food Analysis Institute*. Zeist, Pays Bas. **1989**.
- Marais, J. Terpenes in the aroma of grapes and wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1983**, *4*, 49-60.
- Marais, J. The effect of pH on esters and quality of Colombard wine during maturation. *Vitis*. **1978**, *17*, 396-403.
- Marais, J.; Pool, H.J. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*. **1980**, *19*, 151-164.
- Marais, J.; Rapp, A. Effect of skin contact, time and temperature on juice and wine composition and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1988**, *9*, 22-30.
- Marais, J.; van Wyk, C.J.; Rapp, A. Effect of storage time, temperature and region on the levels of TDN and other volatiles, and on quality of Weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 33-44.

- Marchand, S.; Revel, G.; Bertrand, A. Approaches to wine aroma: release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4890-4895.
- Marengo, E.; Aceto, M.; Maurino, V. Classification of Nebbiolo-based wines Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds. *J. Chromatogr.* **2001**, *943*, 123-137.
- Martin, B.; Etiévant, P.; Le Quere, J.L.; Schilch, P. More clues about sensory impact of sotolon in some flor sherry wines. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 475-478.
- Martineau, B.; Henick-Kling, T. Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC118 and malolactic fermentation with *Leuconoctoc oenos* strain MCW. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 442-448.
- Masuda, M.; Okawa, E.; Nishimura, K.; Yunome, H. Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone and ethyl 9-hydroxynonanoate in Botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristics. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2707-2710.
- Mateo, J. J.; Jiménez M. Monoterpenes in grape juice and wines. Review. *J. Chromatogr.* **2000**, *881*, 557-567.
- Mateo, J.J.; Di Stefano, R. Description of β -glucosidase activity of wine yeasts. *J. Food Microbiology.* **1997**, *14*, 583-591.
- McCasakill, D.; Croteau, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 349-355.
- Meilgaard M.C. Flavour chemistry of beer. Part II: flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly.* **1975**, *12*, 151-168.
- Mesias, J.; Maynar, J.; Henao, F.; Mareca, I. Alcools et aldéhydes herbacées en C₆ dans les raisins et les moûts en fermentation alcoolique. *Rev. Fr. Oenol.* **1983**, *90*, 51-58.
- Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma – Review. *J. Chromatogr.* **2000**, *881*, 569-581.
- Mestres, M.; Sala, C.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Aplicación de la SPME a la determinación de compuestos aromáticos en vinos y mostos. 9^{as}. *Jornadas de Análisis Instrumental.* **2001**, Barcelona.
- Miller J.C.; Amon J.M.; Simpson R.F. Loss of aroma compound in carbon dioxide effluent during white wine fermentation. *Food Technology in Australia.* **1987**, *39*, 246-253.

- Moio, L.; Etiévant, P.X. Ethyl antranilate, ethyl cinnamate, 2,3-dihydrocinnamate, and methyl antranilate: four important odorants identified in pinot noir wines of Burgundy. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *49*, 392-398.
- Moll, M.; Moll, N. Voies principales de formation des composés carbonylés par condensation aldolique. *Revue de la Brasserie et des Boissons.* **1990**, *6*, 99-122.
- Monje, M-C.; Privat, C.; Gastine, V. Nepveu, F. Determination of ethyl phenols compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Anal. Chimica Acta.* **2002**, *458*, 111-117.
- Montedoro, G.; Ricci, A. Il composti aromatici di derivazione fermentativa della produzione di vini provenienti della uve non aromatici. *The aromatic substances in grapes and wines.* A. Scienza e G. Versini (Ed.), S. Michelle. Italy. **1989**, 133-158.
- Moret, I.; Scarponi, G.; Capodaglio, G.; Zanin, S.; Camaiani, G.; Toniolo, A. Analytical parameters in the characterization of three Venetian wines. Application of statistical linear discriminant analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **1980**, *31*, 245-249.
- Moyano, L.; Zea, J.; Moreno, J.; Medina, M. Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7356-7361.
- Müller, C.J.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Lactones in wines. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1973**, *24*, 5-6.
- Murata, K.; Fukuda, Y.; Watanabe, K.; Saikusa, T.; Shimosaka, M.; Kimura, A. Characterization of methylglyoxal synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem and Bioph. Res. Comm.* **1985**, *131*, 190-198.
- Murray, K.E.; Whitefield, F.B. The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *28*, 973-986.
- Noble A.C.; Flath, R.A.; Forrey, R.R. Wine headspace analysis. Reproducibility and application to varietal classification. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 346-353.
- Noble A.C.; Strauss, C.R.; Williams, P.J.; Wilson, B. Contribution of terpene glycosides to bitterness in Muscat wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 129-131.
- Nuñez, J.M.; Bemelmans, H. *J. Chromatogr.* **1984**, *294*, 361-366.
- Nykänen L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 84-96.
- Oliveira, J.M.M. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho. *Tese de Doutorado.* Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho. **2001**.

- Ollivier C.; Stonestreet T.; Dubourdiou D. Incidence de la composition colloïdale des moûts blancs sur leur fermentescibilité. *Conn. Vigne Vin*. **1987**, 21, 59-70.
- Ong, K.C.; Acree, T.E. Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Ilitchi chinensis* Sonn) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 665-670.
- Ortega, C.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr.* **2001**, 923, 205-214.
- Otsuka, K.I.; Sato, K.; Yamashita, T. Structure of a precursor of β -methyl- γ -octalactone. An aging flavor compound of distilled liquors. *J. Ferment. Technol.* **1980**, 58, 395-398.
- Ough, C.S. Volatile nitrogen compounds in fermented beverages. In: *Flavour research of alcoholic beverages. Instrumental and sensory analysis*. Foundation for Biotechnical & Industrial Fermentation Research, L. Nykänen and P. Lehton (Eds.), June 13-15 Helsinki, Finland. **1984**, 199-255.
- Ough, C.S.; Bell, A.A. Effect of nitrogen fertilization of grape vines on amino acid metabolism and higher alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1980**, 31, 122-123.
- Park S.K.; Boulton R.; Bartra E.; Noble A.C. Incidence of volatile sulfur compounds in California wines. A preliminary survey. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, 45, 341-344.
- Park, S. K.; Noble, A. C. Monoterpenes and monoterpene glycosides in wine aromas. *Beer and wine production – Analysis, characterization and technological advances*. ACS Symposium. Series 536. **1993**.
- Pawliszyn, J. Applications of solid phase microextraction. RSC Chromatography Monographs. Series Ed. Roger M. Smith, **1999**.
- Pena, R.; Latorre, M.; Garcia, S.; Botana, A.M.; Herrero, C. Pattern recognition analysis applied to classification of Galician (NW Spain) wines with Certified Brand of Origin Ribeira Sacra. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 2052-2056.
- Penninckx, M.J.; Jaspers, C.J.; Legrain, M.J. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 6038-6038.
- Pérez-Prieto, L. J.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Mínguez, F. P.; Gómez-Plaza, E. Maturation wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3272-3276.
- Peynaud, E.; Guimberteau, G. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. *Ann. Technol. Agric.* **1962**, 11, 85-105.

- Pham, T.; Guichard, E.; Charpentier, C. Conditions optimales de formation du sotolon à partir de l'acide α -cétobutyrique dans le vin jaune du Jura. In: *Œnologie 95; 5^e Symposium International d'Oenologie*. Bordeaux, Lavoisier, Tec-Doc, Paris, **1996**, 613-616.
- Pham, T.; Guichard, E.; Pascal, S.; Charpentier, C. Optimal conditions for the formation of sotolon from α -cétobutyric acid in the French "vin Jaune". *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2616-2619.
- Pozo-Bayón, M.A.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C. Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Its application to the characterization of varietal wines. *J. Chromatogr.* **2001**, *922*, 267-275.
- Quain, D.E. Studies of yeast physiology-impact of fermentation performance and product quality. *J. Int. Brew.* **1988**, *95*, 315-323.
- Radler, F. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G., Ed.; Harwood Academic Publishers, Newark, NJ. **1993**, 184.
- Ramey D.D.; Bertrand, A.; Ough C.S.; Singleton, V.L.; Sanders, E. Effects of skin contact temperature on Chardonnay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 99-106.
- Ramey D.D.; Ough C.S. Volatile ester hydrolysis on formation during model solutions and wines. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 928-934.
- Rapp, A. In: *Frontiers of Flavor*. Charambolous Ed., Elsevier, Amsterdam. **1987**, 799.
- Rapp, A. In: H.F. Linskens, J.F. Jackson (Eds), *Wine Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, **1988**, 28.
- Rapp, A. Natural flavours of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, *337*, 777-785.
- Rapp, A. Possibilities of characterizing wine varieties by means of volatile flavor compounds. In: *Food Flavors: Generation, analysis and process influence*. G. Charamlabous (Ed.), 8th International Flavor Conference, Cos, Greece, 6-8 July, Elsevier, **1995**, 1702-1722.
- Rapp, A.; Güntert, M. Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. *Proceedings of the International Flavour conference*. **1985a**, 141-167.
- Rapp, A.; Güntert, M.; Almy, J. Identification and significance of several sulphur containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 219-221.
- Rapp, A.; Hastrich, H.; Engel, L. Gas chromatographic investigations on the aroma constituents of grape berries. Concentration and separation by capillary glass column. *Vitis*. **1976**, *15*, 183-192.

- Rapp, A.; Mandery, H. Wine aroma. *Experientia*, **1986**, *42*, 873-884.
- Rapp, A.; Versini, G. Influence of nitrogen compounds grapes on aroma compounds of wines. In: *Food Flavors - generation, analysis and process influence*. G. Charamlabous (Ed.), 8th International Flavor Conference, Cos, Greece, 6-8 July, Elsevier, **1995**, 1659-1694.
- Rapp, A.; Versini, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds in wine. In: Rantz J. Editor. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA. **1991**, 156-164.
- Razungles A. Contribution à l'étude des caroténoïdes du raisin: teneur et localisation dans la baie, évolution au cours de la maturation. *Thèse de Docteur-Ingénieur en Sciences Alimentaires*. École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. **1985**.
- Razungles, A.; Bayonove, C.L. Les caroténoïdes du raisin et leur potentialité aromatique. In: *La Viticulture à l'Aube du III^{ème} Millénaire*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. **1996**, 85-88.
- Razungles, A.; Günata, Y.Z.; Baumes, R.; Pinatel, S.; Bayonove, Étude quantitative des composés terpéniques, norisoprénoïdes et de leurs précurseurs dans divers variétés de raisins. *Sci. Aliments*. **1993**, *13*, 59-72.
- Razungles, A.; Tarhi, El H.; Baumes, R.; Günata Y.Z., Tapiero, C.; Bayonove, C.L. Analyse rapide des composés volatiles du raisin et du vin par extraction aux micro-ondes. *Sci. Aliments*. **1994**, *14*, 725-739.
- Rebolo, S.; Peña, R.M.; Latorre, M.J.; García, S.; Botana, A.M.; Herrero, C. Characterization of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis. *Anal. Chimica Acta*. **2000**, *417*, 211-220.
- Revel, G.; Bertrand, A. A method for the determination of the carbonyl compounds in wine: Glyoxal and Methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric*. **1993**, *61*, 267-272.
- Ribeiro, P. H. Caracterização de aminoácidos livres em mostos e em vinhos do Porto. Relação com a tipicidade. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto. **1996**.
- Ribeiro, P. H. Compostos aminados vestigiais em vinhos do Alentejo. Aminoácidos livres e carbamato de etilo. *Tese de Doutorado*. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. **2001**.
- Ribéreau-Gayon J.; Peynaud E.; Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud P. *Sciences et Techniques du Vin. I - Analyse et Contrôle des Vins*. Dunod, Paris. **1982**.
- Ribéreau-Gayon, P.; Boidron, J.N.; Terrier, A. Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem*. **1975**, *23*, 1042-1047.

- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Varietal aroma. In: *Handbook of Enology. Volume 2 – The Chemistry of Wine. Stabilization and treatments*. John Willey & Sons Ltd. **2000**, 187-206.
- Riddle, V.; Lorenz, W.F. Nonenzymic polyvalent anion-catalyzed formation of methylglyoxal as an explanation of its presence in physiological systems. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 2718-2724.
- Roberts, D.D.; Pollien, P.; Milo, C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2430-2437.
- Rocha, S.; Coutinho, P.; Barros, A.; Coimbra, M.A.; Delgadillo, I.; Cardoso, A.D. Aroma potential of two bairrada white grape varieties: Maria Gomes and Bical. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4802-4807.
- Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace solid-phase microextraction (SPME) analysis of flavour compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5142-5151.
- Rogerson, F. S.; Castro, H.; Fortunato, N.; Azevedo, Z.; Macedo, A.; De Freitas, V. A. P. Chemicals with sweet aroma descriptors found in Portuguese wines from the Douro region: 2,2,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione and diacetyl. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 263-289.
- Rohmer, M. The discovery of a mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.
- Roufet M.; Bayonove C.; Cordonnier R. Étude de la composition lipidique du raisin *Vitis vinifera*. I – évolution au cours de la maturation et localisation dans la baie. *Vitis.* **1987**, *26*, 85-97.
- Sala, C.; Mestres, M. Headspace solid phase microextraction method for determining 3-alkil-2-methoxypirazines in must by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fiber. *J. Chromatogr.* **2000**, *880*, 93-99.
- Salinas, M. R.; Alonso, G. L.; Navarro, G.; Pardo, F.; Jimeno, J.; Huerta, M.D. Evolution of the aromatic composition of wines undergoing carbonic maceration under different aging conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 134-144.
- Schlich, P.; Moio, L. Corrélation entre les profils aromatiques et les arômagrammes de vins de Bourgogne issus du cépage Chardonnay. *Sci. Aliments.* **1994**, *14*, 609-615.

- Schreier, P. Wine aroma: challenge for the instrumental analysis. In *In Vino Analytica Scientia*, 1997, 17. Ecole Européenne de Chimie Analytique: Bordeaux, France, June.
- Sefton, M. A.; Francis, I. L.; Williams, P. J. The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 359-369.
- Sefton, M.A.; Francis, I.L.; Williams, P.J. Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirits maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2045-2049.
- Serot, T.; Prost, C.; Visan, L.; Burcea, M. Identification of main odor active compounds in must from French and Romanian hybrids by three olfactometric methods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1909-1914.
- Shinoara T.; Shimizu, Y. Esterification rates of main organic acids in wines. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 2351-2358.
- Shreier, P. Flavor composition of wines: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.* **1979**, *12*, 59-111.
- Shreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 331-335.
- Shulthess D.; Etlinger L. Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols. *J. Int. Brew.* **1978**, *84*, 240-243.
- Shutte, L. Precursors of Sulfur containing flavor compounds. In: *Fevaroli's Handbook of Flavor Compounds*. CRC Press, Cleveland. **1975**, 184-277.
- Silva Ferreira, A.C. Caractérisation du vieillissement du vin de Porto. Approche chimique et statistique. Rôle aromatique du sotolon. *Thèse de Doctorat (n° 593) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2*. **1998**.
- Silva Ferreira, A.C.; Barbe, J-C.; Bertrand, A. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone a key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, *51*, 4356-4363.
- Silva Ferreira, A.C.; Barbe, J-C.; Bertrand, A. Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in Port wines: evolution with aging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2560-2564.
- Silva Ferreira, A.C.; Bertrand, A. Évolutions de quelques constituants du vin de Porto au cours du vieillissement. Étude particulière de composés carbonylés. In: *Œnologie 95; 5^e Symposium International d'œnologie*. **1996**. Bordeaux, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 520-523.

- Silva Ferreira, A.C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003a**, *51*, 1377-1381.
- Silva Ferreira, A.C.; Rodrigues, P.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Influence of some technological parameters on the formation of dimethyl sulfide, 2-mercaptoethanol, metionol, and dimethyl sulfone in Port wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 727-732.
- Simpson, R.F. Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and aging. *Vitis*. **1978**, *17*, 274-287.
- Simpson, R.F. Aroma composition of aged bottle wine. *Vitis*. **1979b**, *22*, 51-63.
- Simpson, R.F. Some important aroma components of white wine. *Food Technology in Australia*. **1979**, 516-526.
- Simpson, R.F. Volatile aroma components of Australian port wines. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, 214-222.
- Simpson, R.F.; Miller, G.C. Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*. **1983**, *22*, 51-63.
- Singleton, V.L.; Sieberhagen, H.A.; de Wet, P.; van Wyk, C.J. Composition and sensory qualities of wines prepared from white grapes by fermentation with and without grape solids. *Am. J. Enol.Vitic.* **1975**, *26*, 62-69.
- Soles, R.A.; Ough, C.S.; Kunkel R.E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol.Vitic.* **1982**, *33*, 94-98.
- Soufleros, E.; Bertrand, A. Incidence de l'action conjuguée de la température de fermentation et de l'acidité du milieu sur les teneurs en substances volatiles formés par les levures. *Conn. Vigne Vin*. **1980**, *14*, 97-109.
- Soufleros, E.; Bertrand, A. Rôle de la souche de levure dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Conn. Vigne Vin*. **1979**, *13*, 181-198.
- Spayd, S.E.; Anderson-Bagge, J. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol.Vitic.* **1996**, *47*, 389-402.
- Spillman, P.J.; Pollnitz, A.P.; Liacopoulos, D.; Pardon, K.H.; Sefton, M. A. Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol and vanillyl alcohol, and their ethyl ethers in barrel-aged wines. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 657-663.
- Spillman, P.J.; Pollnitz, A.P.; Liacopoulos, D.; Skouroumounis, J.K.; Sefton, M.A. Accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red and model wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2584-2589.

- Steffen, A.; Pawliszyn, J. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2187-2193.
- Strauss, C.R.; Dimitriadis, E.; Wilson, B.; Williams, P. Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatiles C₁₃ norisoprenoids of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 145-149.
- Strauss, C.R.; Wilson, B.; Anderson, R.; Williams, P. Development of precursors of C₁₃ norisoprenoid flavorants in Riesling grapes. *Am J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 23-27.
- Strauss, C.R.; Wilson, B.; Gooley P.R.; Williams, P.J. Role of monoterpenes in grape and wine flavor. In: *Biogenesis of Aromas*. T.H. Parliament and R. Croteau (Eds.). ACS Symposium Series 317, American Chemical Society, Washington. **1986a**, 222-242.
- Strydom, M. Caractérisation de 14 souches de levures par leurs capacités de fermentation et par la composition et qualité du vin. *Bull. O.I.V.* **1985**, *58*, 218-227.
- Suomalainen, H.; Ronkainen, P. Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. *Nature.* **1968**, *220*, 792-793.
- Susler, H.; Habegger, M.; Buchi, W. Synthesis and sensory evaluation of 3,4-disubstituted 2-hydroxy-2-buten-1,4-olides. *Z. Lebensm. Unters. Forsh.* **1972**, *148*, 215-221.
- Tang, C.S.; Jennings, W.G. Lactonic compounds of apricot. *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 252-254.
- Tapias, R.M.; Larrechi, M.S.; Guasch, G.; Rubio, J.; Rius, F.X. Enological parameters and pattern recognition methods in the geographic differentiation of Spanish red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 195-201.
- Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc et sa genèse à partir de précurseurs du raisin. *Rev.Œnologues.* **2000**, *97*, 22-28.
- Tominaga, T.; Guyot R.B.; Peyrot des Gachons C.; Dubourdieu, D. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178-181.
- Tominaga, T.; Murat, M-L.; Dubourdieu, D. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1044-1048.
- Towey, J.P.; Waterhouse, A.L. The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in Chardonnay during three successive vintages. *Am J. Enol. Vitic.* **1993**, *47*, 163-172.

- Urruty L.; Montury, M. Influence of ethanol on pesticide extraction in aqueous solutions by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *43*, 3871-3877.
- Usseglio-Tomasset, L. Chimie Œnologique, 2^e édition, Cap. 12, *Chimie des Fermentations*. **1995**, 119-154.
- Vas, G.; Kőteleky, K.; Farkas, M.; Dobó, A.; Vékey, K. Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 100-104.
- Versini, G.; Dalla Serra, A.; Dell'Eva, M. Evidence of some glycosidically bond new monoterpenes and norisoprenoid in grapes. *Bioflavour'87*. **1988**. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Versini, G.; Dalla Serra, A.; Scienza, A.; Barcheti, P. Particolarità compositive dell'uva e del vino Traminer aromatico. *Atti Simposio sul Traminer Aromatico*, Bolzano. **1990**, 59-71.
- Versini, G.; Inama, S.; Sartori, G. Indagine gas cromatografica in colonna dei costituenti terpenici del terpenici de Riesling Renamo del Trentino Alto Adige: distribuzione nell'acino, passaggio nel mosto e presenza nel vino a seconda di diverse tecniche di vinificazione. Considerazioni organolettiche. *Vini d'Italia*. **1981**, *23*, 189-211.
- Versini, G.; Orriols, I.; Dalla Serra, A. Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. *Vitis*. **1994**, *33*, 165-170.
- Versini, G.; Rapp A. A new TDN precursor isolated from Reisling grape products: partial structure elucidation and possible reaction mechanism. *Vitis*. **1996**, *35*, 15-21.
- Vieira, A. Breviário da vinha e do vinho na Madeira. Eurosigno publicações. **1991**.
- Voirin, S.; Baumes, R.; Bitteur, S.M.; Günata, Y.Z.; Bayonove, C.L. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1373-1378.
- Voirin, S.; Baumes, R.; Sapis, J.C.; Bayonove, C.L. Analytical methods for monoterpene glycosides in grapes and wine. II. Qualitative and quantitative determinations of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.* **1992**, *595*, 269-281.
- Wada, K.; Shibamoto, T. Isolation and identification of volatile compounds from a wine using solid phase extraction, gas chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4362-4366.
- Walker, T.; Morris, J.; Threlfall, R.; Main, G. Analysis of wine components in Cynthiana and Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1543-1547.
- Wattanabe, N.; Messerer, M.; Winterhalter, H. Uncommon glycoconjugates of 2-phenylethanol from rose flowers and Riesling wine. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 39-42.

- Webb, A.D.; Kepner, R.E.; Galetto, W.G. Volatile components of sherry wine. II Isolation and identification of n-(2-phenylethyl)-acetamide and N-isoamylacetamide. *Am. J. Enol. Vitic.* **1966**, *17*, 1-10.
- Webb, A.D.; Kepner, R.E.; Maggiora, L. Sherry aroma. VI Some volatile components of flor sherry of Spanish origin. Neutral substances. *Am. J. Enol. Vitic.* **1967**, *18*, 190-199.
- Williams, P.G.; Lewiss, M.J.; May, H.V. The volatile flavour components of commercial Port wines. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 311-319.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R. Studies of volatile components in the dichloromethane extracts of Australian flor sherries: the identification of the isomeric ethylidene glycerols. *J. Inst. Brew.* **1978**, *48*, 144-147.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B. Classification of the monoterpenoid composition of muscat grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1981**, *32*, 230-235.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B. Hydroxilated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, *28*, 766-771.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B. Use of C₁₈ reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **1982**, *235*, 471-480.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B.; Dimitriadis, E. Recent studies into grape terpene glycosides. In: *Progress in Flavor Research*. J. Adda (Ed.), Elsevier, Amsterdam. **1984**, 349-357.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B.; Massy-Westropp R.A. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene-β-D-glucosides rationalizing the monoterpene composition grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1982a**, *30*, 1219-1223.
- Wilson, B.; Strauss, C.R.; Williams, P.J.; Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 919-924.
- Wilson, B.; Strauss, C.R.; Williams, P.J.; The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice and pulp fractions of some of white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 107-111.
- Winterhalter P. The generation of C₁₃ norisoprenoid volatiles in Riesling wine. In: *Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins*. C.L. Bayonove; J. Crouzet; C. Flanzky; Martin; J.C. Sapis (Eds.) *Rev. Fr. d'Enol.*, Lattes, France. **1993**, 65-73.

- Yamaguchi, M.; Xuan-Xuan, Z.; Nakamura, M.; Yoshitake, T. Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 2,3-pentanedione in fermented food by HPLC with fluorescent detection. *J. Liquid Chromatogr.* **1994**, *17*, 203-211.
- Yang, X.; Pèpard, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
- Zhou, Y.; Riesen, R.; Gilpin, C.S. Comparison of Amberlite XAD-2/Freon 11 extraction with liquid/liquid extraction for the determination of wine flavor components. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 818-822.

ANEXOS

***Dados referentes à composição livre aromática das uvas mostos e vinhos
monovarietais da vindimas de 1998, 1999 e 2000***

Tabela 1. AA	Áreas relativas expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol) dos compostos voláteis da fracção livre do aroma das uvas nas diferentes variedades em estudo, agrupados por família química, extraídos por SPME com fibra de poliacrilato de acordo com as condições do quadro I	272
Tabela 2. AA	Áreas médias relativas (expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol)) dos compostos voláteis da fracção livre do aroma dos mostos nas diferentes variedades em estudo, agrupados por família química, extraídos por SPME com fibra de poliacrilato de acordo com as condições do quadro I	275
Tabela 3. AA	Áreas médias relativas (expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol)) dos compostos voláteis da fracção livre do aroma dos vinhos nas diferentes variedades em estudo, agrupados por famílias químicas, extraídos por SPME com fibra de poliacrilato de acordo com as condições do quadro I	280
Tabela 4. AA	Áreas médias relativas, expressas em função do octan-3-ol, para os principais ésteres etílicos dos ácidos fixos obtidas por HS-SPME	285
Tabela 5. AA	Compostos voláteis livres identificados nos vinhos das diferentes castas estudadas, resultantes da extracção líquido-líquido com diclorometano	286
Tabela 6. AA	Valores médios encontrados para os principais ésteres etílicos dos ácidos gordos	287
Tabela 7. AA	Espectros de massa e estrutura molecular dos acetais analisados	287

Tabela 1. AA - Áreas médias* relativas expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol), dos compostos voláteis da fração livre aromática das uvas nas diferentes variedades estudadas, agrupados por família química, extraídos por SPME com fibra de poliacrilato de acordo com as condições do quadro 1 (UB – Uvas Boal; UM – Uvas Malvasia; US – Uvas Sercial; UV – Uvas Verdelho).

RI	Família/Composto	Áreas relativas - Ac/Api (CV %)			
		UB	UM	US	UV
Terpenos					
1138	3-careno	0,4 (12)	1,3 (22)	2,5 (20)	4,3 (25)
1166	β -pineno	8,9 (19)	6,7 (17)	20,2 (33)	25,0 (28)
1188	(-)-limoneno	392,1 (22)	436,3 (18)	615,9 (16)	1173,9 (24)
1193	β -felandreno	1,1 (10)	1,0 (13)	3,3 (11)	5,2 (19)
1223	β -Ocimeno	nd	1,3 (9)	2,5 (12)	4,1 (11)
1233	α -Ocimeno	5,2 (7)	4,2 (11)	10,2 (22)	19,5 (23)
1252	<i>p</i> -cimeno	nd	0,4 (11)	nd	0,7 (19)
1262	α -terpineno	nd	0,4 (21)	0,5 (13)	0,8 (12)
1277	canfeno	nd	nd	nd	1,1 (13)
1379	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	nd	0,4 (9)	nd	nd
1474	copaeno	2,1 (11)	nd	nd	nd
1547	τ -muroleno	nd	nd	nd	0,6 (11)
1597	(-)-aristoleno	1,0 (17)	nd	nd	nd
1612	(-)-gurjuneno	0,8 (14)	nd	nd	nd
1651	β -ciclocitral	0,8 (13)	0,7 (16)	0,2 (21)	1,1 (16)
1656	α -cariofileno	nd	nd	nd	0,5 (12)
1658	cariofileno	0,2 (11)	nd	nd	1,0 (13)
1687	δ -selineno	0,3 (12)	nd	nd	nd
1691	limoneno diepóxido	nd	0,5 (22)	0,3 (14)	0,7 (12)
1695	α -cububeno	5,3 (28)	nd	nd	0,5 (20)
1709	(+)-cadineno	1,7 (17)	nd	nd	nd
1734	D(+)-carvona	nd	1,7 (18)	1,0 (15)	nd
1738	neral	0,3 (12)	1,7 (14)	nd	1,0 (17)
1752	α -farneseno	2,3 (9)	nd	0,4 (12)	4,3 (7)
	Subtotal (Ac/Api)	30,6	20,4	41,3	70,3
	Subtotal (%)	7,6	6,6	25,1	25,8
Álcoois monoterpénicos					
1555	linalol	35,7 (18)	21,3 (21)	14,1 (13)	10,5 (19)
1603	terpine-4-ol	2,3 (12)	1,2 (10)	1,3 (11)	2,1 (8)
1636	isopulegol	nd	1,3 (15)	nd	nd
1704	α -terpineol	2,0 (17)	1,5 (9)	0,5 (17)	nd
1764	<i>cis</i> -carveol	0,3 (21)	0,2 (12)	nd	nd
1785	citronelol	1,3 (15)	1,2 (15)	1,3 (11)	1,7 (7)
1819	nerol	2,3 (19)	1,8 (16)	nd	0,9(13)
1850	<i>trans</i> -carveol	1,6 (21)	0,9 (16)	1,3 (14)	nd
1865	geraniol	12,9 (14)	5,7 (23)	nd	9,2 (15)
2205	farnesol	3,5 (18)	1,5 (14)	0,5 (10)	1,7 (12)

RI	Família/Composto	Áreas relativas - Ac/Api (CV %)			
		UB	UM	US	UV
	(continuação)				
	Subtotal Ac/Api	62,0	36,6	19,0	26,1
	Subtotal (%)	15,4	11,9	11,6	9,6
	Norisoprenóides em C₁₃				
1829	β-damascenona	0,3 (4)	0,3(11)	0,1 (13)	nd
1937	β-ionona	2,3 (31)	1,4 (19)	0,6 (21)	1,1 (8)
	Subtotal Ac/Api	2,7	1,6	0,7	1,1
	Subtotal (%)	0,7	0,5	0,4	0,4
	Álcoois superiores				
1366	hexan-1-ol	13,5 (27)	7,6 (14)	4,5 (9)	6,5 (7)
1395	(Z)- hex-3-en-1-ol	nd	2,3 (13)	0,9 (11)	1,3 (9)
1417	(Z)- hex-2-en-1-ol	5,1 (11)	2,3 (6)	2,5 (16)	10,7 (17)
1665	nonan-1-ol	2,9 (9)	nd	nd	nd
1886	álcool benzílico	5,2 (8)	2,9 (11)	1,6 (10)	33,0 (25)
1916	2-feniletanol	2,4 (16)	1,7 (13)	2,0 (7)	3,5 (8)
	Subtotal Ac/Api	29,1	16,8	11,5	55,1
	Subtotal (%)	7,2	5,5	7,0	20,2
	Ácidos gordos voláteis				
1458	ácido acético	35,9 (8)	27,9 (12)	37,7 (16)	15,4 (6)
1544	ácido propanóico	0,6 (19)	0,4 (13)	0,9 (5)	0,1 (7)
1859	ácido hexanóico	28,0 (11)	14,3 (18)	3,6 (11)	8,7 (13)
1963	ácido (E)-hex-2-enóico	6,3 (10)	5,5 (12)	3,0 (14)	1,8 (89)
2037	ácido octanóico	0,5 (20)	nd	0,4 (17)	0,3 (11)
2198	ácido decanóico	nd	0,2 (11)	nd	0,3 (9)
2342	ácido dodecanóico	0,6 (149)	0,9 (19)	nd	0,5 (11)
2460	ácido tetradecanóico	5,9 (8)	2,9 (11)	nd	3,1 (16)
	Subtotal Ac/Api	77,8	52,2	45,7	30,3
	Subtotal (%)	19,4	17,0	27,8	11,1
	Ésteres				
1228	hexanoato de etilo	9,0 (9)	3,1 (12)	nd	3,1 (17)
1826	acetato de 2-feniletilo	0,2 (13)	0,2 (8)	0,1 (11)	0,1 (19)
2181	palmitato de etilo	0,4 (14)	nd	nd	0,6 (13)
	Subtotal Ac/Api	9,6	3,3	0,1	3,8
	Subtotal (%)	2,4	1,1	0,04	1,4
	Aldeídos/ Cetonas				
1119	hexanal	78,6 (14)	39,4 (11)	10,5 (139)	31,6 (7)
1223	(E)-hex-2-enal	74,3 (12)	22,7 (17)	9,4 (25)	28,7 (10)
1426	(E)-oct-2-enal	3,3 (5)	3,2 (14)	1,8 (12)	2,7 (11)
1516	benzaldeído	2,5 (10)	1,8 (9)	0,7 (11)	1,7 (15)
1530	(Z)-non-6-enal	2,5 (11)	1,1 (6)	nd	1,4 (12)
1759	2-(1-metilpropil)ciclopentanona	nd	1,1 (11)	nd	nd

Áreas relativas - Ac/Api (CV %)					
RI	Família/Composto	UB	UM	US	UV
	<i>(continuação)</i>				
1781	2-propilciclo-hexan-1-ona	1,7 (13)	1,7 (8)	3,4 (6)	nd
	Subtotal Ac/Api)	163,0	71,4	25,7	66,0
	Subtotal (%)	40,6	23,7	17,9	24,3
	Furanos				
1432	5-metil-2(3H)-furanona	nd	nd	0,18 (15)	nd
1465	2,5-dimetilfurano	5,4 (11)	7,9 (16)	9,08 (8)	3,6 (17)
1572	5-metilfurfural	nd	3,4 (11)	1,32 (9)	0,4 (8)
1665	2-furanometanol	nd	5,0 (13)	1,09 (12)	1,7 (21)
1673	5-metil-2(5H)-furanona	0,04 (22)	0,1 (9)	nd	nd
1756	γ-butirolactona	nd	nd	0,11 (14)	nd
1846	cicloteno	nd	1,5 (8)	3,6 (18)	nd
2095	3-furanometanol	nd	nd	0,16 (12)	nd
2135	5-(acetoximetil)furfural	nd	1,0 (11)	2,36 (21)	0,4 (16)
2190	DDMP	3,3 (16)	16,4 (14)	1,22 (7)	0,4 (13)
2350	5-(hidroximetil)furfural	18,4 (11)	70,0 (28)	1,31 (12)	13,0 (11)
	Subtotal Ac/Api)	27,2	105,4	20,5	19,5
	Subtotal (%)	6,8	34,2	54,4	7,2
	TOTAL (Ac/Api)	794,0	743,7	780,3	1445,9
	<i>TOTAL sem Limoneno (Ac/Api)</i>	402,0 (9)	307,5 (8)	164,5 (25)	272,1 (8)

*n=5; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas; DDMP: 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4-(H)-piran-4-ona

Tabela 2. AA - Áreas médias* relativas, expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol), dos compostos voláteis da fração livre aromática dos mostos nas diferentes variedades estudadas, agrupados por família química. Extração por SPME com fibra de poliacrilato de acordo com as condições do quadro 1.

RI	Família/Composto	1998				1999				2000			
		MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV
Terpenos													
1202	(-)-limoneno	nd	nd	nd	1,1 (8)	nd	nd	nd	1,0 (13)	nd	nd	nd	0,9 (11)
1354	óxido de rosa	nd	0,2 (12)	nd	nd	nd	0,3 (13)	nd	nd	nd	0,3 (12)	nd	nd
1448	<i>trans</i> -óxido de linalol	nd	0,1 (9)	0,8 (15)	nd	nd	0,1 (13)	1,2 (15)	nd	nd	0,1 (17)	0,9 (13)	nd
1476	<i>cis</i> -óxido de linalol	nd	0,3 (13)	0,8 (12)	nd	nd	0,5 (11)	1,2 (12)	nd	nd	0,6 (7)	0,9 (12)	nd
1515	(<i>E,E</i>)-farnesal	nd	0,1(12)	0,5 (11)	0,2 (13)	nd	0,2 (14)	0,7 (9)	0,2 (8)	nd	0,2 (11)	0,5 (7)	0,1 (14)
1555	linalol	2,0 (14)	32,0 (11)	15,4 (8)	7,6 (14)	2,8 (8)	40,6 (16)	13,4 (6)	8,0 (14)	3,1 (11)	25,5 (13)	17,7 (13)	6,1 (16)
1560	des. 1 (C ₁₅ H ₂₄)	0,2 (12)	0,3 (11)	nd	0,3 (11)	0,2 (12)	0,4 (9)	Nd	0,3 (10)	0,2 (16)	0,5 (11)	nd	0,2 (11)
1603	terpine-4-ol	3,4 (13)	1,2 (8)	3,3 (12)	4,7 (14)	3,2 (15)	0,9 (10)	3,5 (8)	5,0 (11)	3,7 (18)	1,0 (7)	3,4 (7)	4,8 (8)
1702	α -terpineol	2,4 (8)	17,6 (9)	4,7 (9)	8,6 (11)	2,5 (7)	15,7 (8)	5,4 (10)	8,4 (9)	3,2 (11)	12,6 (16)	4,8 (10)	8,6 (10)
1707	borneol	nd	0,1 (11)	nd	0,3 (16)	nd	0,2 (13)	nd	0,2 (6)	nd	0,2 (13)	nd	0,2 (8)
1712	δ -selimeno	nd	0,1 (14)	nd	nd	nd	0,1 (12)	nd	nd	nd	0,1 (8)	nd	nd
1739	neral	nd	0,2 (7)	nd	nd	nd	0,2 (15)	nd	nd	nd	0,2 (11)	nd	nd
1752	des. 2 (C ₁₅ H ₂₄)	nd	Nd	0,5 (15)	nd	nd	nd	0,8 (12)	nd	nd	nd	0,6 (6)	nd
1762	δ -cadineno	nd	0,1 (12)	nd	0,3 (6)	nd	0,2 (11)	nd	0,3 (16)	nd	0,2 (13)	nd	0,3
1785	citronelol	4,5 (11)	2,6 (15)	3,2 (9)	10,5 (10)	5,3 (5)	4,0 (13)	4,0 (7)	11,0 (9)	6,6 (12)	3,4 (17)	7,4 (8)	10,8
1819	nerol	3,4 (12)	nd	3,1 (12)	0,9 (11)	2,6 (8)	1,7 (9)	3,6 (10)	0,8 (11)	3,1 (10)	2,3 (15)	3,4 (13)	1,1
1823	des 3 (C ₁₅ H ₂₄)	10,9 (7)	nd	nd	nd	7,7 (11)	nd	nd	nd	8,2 (12)	nd	nd	nd
1865	geraniol	4,8 (9)	10,0 (6)	7,0 (14)	13,2 (13)	4,5 (7)	9,4 (6)	4,9 (11)	14,2 (11)	7,6 (7)	12,1 (8)	6,9 (17)	16,3 (12)
1878	des. 4 (C ₁₂ H ₂₄ O ₃)	11,0 (17)	1,5 (11)	1,6 (10)	4,0 (11)	7,8 (16)	2,0 (8)	2,4 (15)	3,5 (10)	8,4 (11)	2,6 (12)	1,8 (11)	3,3 (13)
1968	des. 5 (C ₁₅ H ₂₄)	5,0 (13)	0,8 (12)	nd	5,7 (16)	3,6 (12)	1,1 (11)	nd	5,1 (13)	3,8 (15)	1,4 (9)	nd	4,7 (7)
2137	(+)-aromadendreno	1,7 (12)	0,4 (11)	nd	0,1 (12)	1,2 (7)	0,5 (15)	nd	0,1 (17)	1,3 (8)	0,7 (11)	nd	0,1 (17)
2162	des. 6 (C ₁₅ H ₂₄)	0,3 (11)	0,2 (9)	0,1 (9)	0,1 (7)	0,3 (12)	0,2 (14)	0,1 (13)	0,1 (11)	0,3 (13)	0,2 (15)	0,1 (15)	0,1 (11)
Subtotal (Ac/Apt)		49,5	67,8	41,0	57,6	41,7	78,3	41,3	58,4	49,4	64,5	48,4	57,8

RI	Família/Composto	1998				1999				2000			
		MIB	MMI	MS	MV	MIB	MMI	MS	MV	MIB	MMI	MS	MV
	<i>(continuação)</i>												
	Subtotal (%)	7,1	10,4	14,5	8,5	6,3	10,9	12,6	8,4	7,7	10,1	16,2	9,1
	Norisoprenóides em C₁₇												
1829	β-damascenona	2,0 (6)	8,6 (12)	2,1 (8)	5,4 (15)	1,3 (14)	7,3 (10)	2,7 (6)	5,2 (15)	2,4 (11)	8,8 (9)	1,7 (12)	4,9 (7)
1937	β-ionona	1,5 (6)	0,8 (9)	1,9 (11)	3,6 (13)	1,7 (8)	1,1 (16)	2,1 (12)	3,7 (9)	1,6 (7)	0,9 (10)	2,1 (13)	3,7 (15)
	Subtotal (Ac/Api)	3,5	9,4	4,0	9,0	3,0	8,4	4,8	8,9	4,0	9,7	3,7	8,5
	Subtotal (%)	0,5	1,4	1,4	1,3	0,5	1,2	1,5	1,3	0,6	1,5	1,2	1,3
	Alcoois superiores												
1166	butan-1-ol	0,6 (9)	5,4 (15)	0,9 (12)	1,3 (5)	0,6 (12)	6,0 (13)	1,0 (4)	1,8 (12)	0,5 (6)	4,0 (10)	0,6 (8)	1,4 (11)
1236	2-metilbutan-1-ol	81,5 (15)	36,1 (9)	7,1 (12)	24,1 (14)	77,5 (11)	39,5 (7)	8,3 (10)	23,6 (11)	69,9 (14)	32,1 (11)	7,7 (16)	19,9 (18)
1259	pentan-1-ol	0,7 (13)	19,0 (11)	1,0 (13)	0,2 (8)	0,7 (10)	21,1 (15)	1,1 (9)	0,2 (14)	0,6 (10)	14,1 (13)	0,7 (12)	0,2 (19)
1356	hexan-1-ol	484,0 (11)	442,8 (8)	56,0 (5)	439,6 (16)	489,0 (12)	437,1 (10)	66,8 (13)	425,9 (12)	451,8 (13)	473,2 (16)	61,9 (14)	444,5 (17)
1375	(E)-hex-3-en-1-ol	22,0 (15)	5,4 (12)	1,7 (18)	17,0 (11)	19,2 (15)	5,4 (8)	2,2 (18)	17,8 (9)	17,9 (11)	5,8 (13)	1,9 (7)	14,6 (9)
1394	(Z)-hex-3-en-1-ol	16,4 (12)	134,6 (13)	6,6 (15)	13,7 (7)	20,8 (9)	149,0 (11)	8,2 (11)	14,7 (18)	19,3 (6)	134,2 (8)	7,5 (15)	15,0 (11)
1415	(E)-hex-2-en-1-ol	63,8 (17)	46,3 (12)	51,3 (12)	242,5 (13)	65,6 (17)	50,8 (18)	61,6 (12)	237,3 (11)	60,3 (8)	45,4 (11)	57,0 (12)	200,3 (14)
1423	(Z)-hex-2-en-1-ol	6,6 (11)	1,7 (7)	0,7 (9)	2,9 (6)	6,6 (8)	1,7 (13)	1,0 (17)	4,0 (15)	6,0 (15)	1,1 (12)	1,0 (13)	3,5 (16)
1459	oct-3-en-1-ol	4,2 (15)	4,7 (11)	11,3 (16)	1,7 (14)	4,0 (11)	5,2 (10)	12,6 (12)	2,4 (12)	3,4 (10)	3,5 (13)	8,4 (6)	1,9 (10)
1465	heptan-1-ol	5,1 (12)	5,8 (9)	5,9 (11)	1,7 (12)	4,9 (12)	6,5 (12)	6,6 (8)	2,3 (8)	4,2 (7)	4,4 (15)	4,4 (9)	1,9 (12)
1727	3-metilpropan-1-ol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1886	álcool benzílico	69,4 (13)	7,8 (14)	14,5 (13)	35,7 (8)	64,2 (11)	8,3 (15)	17,4 (7)	35,4 (13)	59,4 (12)	6,3 (13)	16,3 (15)	29,5 (16)
1917	2-feniletanol	126,6 (8)	68,6 (9)	36,4 (16)	74,8 (12)	111,2 (13)	75,2 (12)	43,5 (15)	72,5 (8)	112,3 (9)	72,8 (12)	40,4 (9)	74,0 (13)
2097	2-fenoxietanol	0,9 (12)	nd	1,4 (11)	0,2 (5)	0,8 (16)	nd	1,6 (10)	0,3 (12)	0,7 (6)	nd	1,1 (11)	0,2 (7)
	Subtotal (Ac/Api)	881,8	778,1	194,8	855,5	865,2	805,7	231,8	838,0	806,4	796,8	208,9	806,9
	Subtotal (%)	57,0	51,3	49,0	61,5	56,7	51,5	50,5	59,6	55,7	50,8	49,2	57,4

RI	Família/Composto	1998				1999				2000			
		MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV
<i>(continuação)</i>													
Acetatos de álcoois superiores													
1149	acetato de 3-metilbutilo	nd	2,2 (15)	0,2 (12)	0,9 (14)	nd	2,2 (12)	0,3 (8)	1,3 (11)	nd	2,6 (16)	0,2 (10)	0,9 (12)
1275	acetato de hexilo	6,2 (12)	20,9 (10)	0,3 (17)	7,0 (6)	1,8 (9)	23,6 (12)	0,4 (13)	8,8 (5)	1,1 (9)	20,8 (11)	0,3 (15)	6,7 (7)
1825	acetato de 2-feniletilo	11,7 (11)	3,8 (9)	1,5 (12)	8,1 (11)	10,8 (18)	3,7 (13)	1,5 (7)	8,4 (15)	9,1 (13)	4,6 (12)	1,5 (6)	7,2 (9)
	Subtotal (Ac/Apl)	17,9	26,9	2,0	16,0	12,5	29,5	2,1	18,5	10,2	28,1	2,0	14,8
	Subtotal (%)	2,6	4,1	0,7	2,4	1,9	4,1	0,7	2,7	1,6	4,4	0,7	2,3
Ácidos gordos voláteis													
<i>(2)</i>													
1454	ácido acético	22,5 (9)	32,7 (5)	12,7 (13)	44,0 (15)	20,6 (8)	31,2 (10)	16,4 (14)	48,4 (10)	24,4 (14)	34,6 (12)	14,8 (11)	50,4 (8)
1540	ácido propanóico	0,2 (14)	0,4 (11)	0,3 (12)	0,4 (10)	0,2 (12)	0,4 (6)	0,3 (13)	0,4 (12)	0,2 (10)	0,4 (11)	0,3 (17)	0,4 (12)
1670	ácido 3-metilbutanóico	2,9 (16)	3,8 (12)	0,2 (11)	0,7 (8)	2,3 (14)	3,6 (12)	0,4 (11)	1,4 (16)	2,3 (15)	3,4 (16)	0,3 (13)	0,8 (16)
1860	ácido hexanóico	44,6 (7)	21,9 (8)	7,5 (14)	23,7 (10)	41,5 (11)	19,4 (17)	7,4 (9)	24,8 (15)	50,0 (13)	23,3 (15)	8,4 (15)	27,2 (9)
1953	ácido 2-etil-hexanóico	5,2 (13)	3,8 (15)	2,7 (13)	3,7 (11)	6,7 (13)	4,3 (11)	3,6 (12)	4,7 (10)	7,7 (12)	3,4 (9)	3,3 (10)	3,6 (10)
1956	ácido (E)-hex-3-enóico	nd	1,7 (13)	nd	nd	nd	2,6 (10)	nd	nd	nd	1,5 (8)	nd	nd
1962	ácido (E)-hex-2-enóico	5,3 (12)	1,3 (16)	0,6 (19)	3,5 (11)	5,0 (15)	2,3 (15)	0,7 (12)	3,8 (9)	5,7 (8)	1,4 (13)	0,6 (12)	3,3 (11)
2042	ácido octanóico	31,3 (6)	18,4 (18)	7,7 (8)	5,6 (17)	22,9 (12)	14,8 (16)	6,3 (13)	6,5 (13)	34,5 (11)	13,7 (12)	9,3 (13)	7,4 (13)
2115	ácido nonanóico	12,6 (13)	5,2 (10)	8,3 (12)	3,2 (12)	12,7 (9)	4,5 (8)	8,8 (7)	4,5 (12)	14,2 (9)	5,2 (16)	9,7 (13)	3,9 (15)
2199	ácido decanóico	3,8 (12)	0,9 (12)	1,5 (11)	0,7 (6)	3,2 (10)	1,3 (12)	1,8 (12)	1,4 (16)	3,3 (6)	0,8 (15)	1,3 (11)	1,1 (12)
2308	ácido benzóico	0,8 (17)	0,8 (11)	0,9 (13)	1,5 (9)	0,7 (8)	1,2 (13)	0,8 (8)	2,3 (11)	0,9 (8)	1,2 (6)	0,8 (12)	1,7 (15)
2342	ácido dodecanóico	0,5 (11)	0,2 (9)	0,6 (8)	1,4 (12)	0,4 (11)	0,2 (12)	0,7 (14)	1,1 (10)	0,6 (12)	0,1 (8)	0,5 (9)	1,4 (12)
	Subtotal (Ac/Apl)	129,7	91,3	42,9	88,3	116,2	85,9	47,3	99,2	143,8	89,0	49,5	101,3
	Subtotal (%)	18,6	14,0	15,2	13,1	17,5	12,0	14,5	14,3	22,6	14,0	16,6	16,0
Ésteres etílicos de ácidos gordos													
1039	acetato de etilo	34,3 (10)	65,6 (12)	27,9 (15)	81,4 (9)	32,8 (6)	77,0 (5)	33,4 (6)	84,7 (13)	23,5 (12)	69,6 (9)	24,4 (8)	78,4 (12)
1239	hexanoato de etilo	1,0 (13)	23,3 (11)	0,5 (11)	1,2 (12)	1,1 (14)	24,2 (11)	0,5 (13)	0,8 (8)	1,0 (15)	21,9 (9)	0,3 (13)	1,4 (9)
1436	octanoato de etilo	1,2 (8)	6,3 (12)	0,3 (19)	0,2 (10)	1,5 (7)	8,3 (12)	0,4 (9)	0,2 (10)	0,9 (8)	6,3 (7)	0,3 (11)	0,4 (15)

RI	Família/Composto	1998					1999					2000				
		MB	MM	MS	MV		MB	MM	MS	MV		MB	MM	MS	MV	
<i>(continuação)</i>																
1637	decanoato de etilo	1,9 (7)	0,6 (14)	nd	nd	2,9 (12)	0,9 (9)	nd	nd	2,6 (15)	0,9 (13)	nd	nd	nd	nd	
1661	benzoato de etilo	2,2 (9)	0,7 (11)	0,6 (13)	nd	1,7 (10)	0,7 (6)	0,8 (12)	nd	1,9 (16)	0,8 (6)	0,5 (12)	nd	nd	nd	
1693	cis-9-decenoato de etilo	nd	0,1 (16)	nd	nd	nd	0,1 (18)	nd	nd	nd	0,1 (11)	nd	nd	nd	nd	
1796	benzenoacetato de etilo	1,6 (13)	7,0 (10)	0,7 (15)	0,9 (11)	1,6 (12)	7,8 (13)	0,8 (11)	0,6 (12)	1,1 (11)	8,1 (9)	0,7 (10)	1,0 (12)	1,0 (12)	1,0 (12)	
2086	cinamato de etilo	0,5 (15)	0,1 (12)	0,2 (5)	0,1 (9)	0,6 (13)	0,1 (14)	0,1 (10)	0,2 (8)	0,3 (13)	0,1 (12)	0,2 (8)	0,1 (13)	0,1 (13)	0,1 (13)	
	Subtotal (Ac/Api)	42,6	103,7	30,1	83,8	42,1	119,1	35,8	86,4	31,2	107,7	26,5	81,3	81,3	81,3	
	Subtotal (%)	6,1	15,9	10,6	12,4	6,9	16,6	10,9	12,5	4,1	16,9	8,9	12,9	12,9	12,9	
Aldeídos/Cetonas																
1014	acetaldeído	9,6 (11)	10,9 (13)	6,2 (10)	nd	12,7 (16)	14,4 (12)	8,1 (12)	nd	7,3 (7)	8,2 (10)	5,1 (12)	nd	nd	nd	
1516	benzaldeído	19,5 (15)	1,7 (12)	5,5 (8)	1,5 (11)	19,8 (13)	1,7 (7)	5,6 (14)	2,1 (13)	14,8 (12)	1,3 (15)	4,5 (9)	1,8 (11)	1,8 (11)	1,8 (11)	
1634	benzenoacetaldéido	nd	nd	0,9 (14)	0,7 (6)	nd	nd	1,4 (11)	1,5 (6)	nd	nd	0,8 (14)	0,9 (12)	0,9 (12)	0,9 (12)	
	Subtotal (Ac/Api)	29,2	12,6	12,6	2,2	32,5	16,1	15,1	3,6	22,1	9,5	10,3	2,8	2,8	2,8	
	Subtotal (%)	4,2	1,9	4,5	0,3	4,9	2,3	4,6	0,5	3,5	1,5	3,5	0,4	0,4	0,4	
Fenóis voláteis																
1778	salicilato de metilo	6,2 (9)	3,7 (11)	4,9 (12)	0,9 (13)	8,2 (17)	5,0 (12)	6,5 (8)	1,2 (14)	5,1 (12)	2,6 (13)	3,3 (12)	1,0 (10)	1,0 (10)	1,0 (10)	
2002	metileugenol	Nd	nd	0,6 (6)	nd	nd	nd	0,7 (13)	nd	nd	nd	3,3 (12)	nd	nd	nd	
2012	4-etilguaiaacol	4,7 (12)	0,6 (15)	0,6 (15)	nd	6,2 (11)	0,8 (7)	0,8 (10)	nd	3,9 (6)	0,4 (9)	0,4 (12)	nd	nd	nd	
2053	4-etilfenol	1,1 (8)	nd	nd	nd	1,2 (9)	nd	nd	nd	0,9 (12)	nd	nd	nd	nd	nd	
2113	eugenol	10,7 (6)	0,5 (13)	2,4 (8)	0,2 (12)	15,3 (6)	0,7 (10)	3,4 (11)	0,2 (15)	8,8 (12)	0,3 (6)	1,6 (12)	0,2 (11)	0,2 (11)	0,2 (11)	
2252	isoeugenol	0,7 (11)	nd	nd	nd	0,9 (8)	nd	nd	nd	0,6 (17)	nd	nd	nd	nd	nd	
	Subtotal (Ac/Api)	23,4	4,8	8,5	1,1	31,7	6,5	11,4	1,4	19,2	3,4	8,6	1,2	1,2	1,2	
	Subtotal (%)	3,4	0,7	3,0	0,2	4,8	0,9	3,5	0,2	3,0	0,5	2,9	0,2	0,2	0,2	
Compostos furânicos																
2007	γ-dodecalactona	2,8 (5)	0,8 (8)	1,5 (10)	0,7 (7)	5,6 (15)	1,4 (14)	1,9 (11)	1,0 (15)	1,9 (9)	0,9 (7)	1,2 (6)	0,5 (8)	0,5 (8)	0,5 (8)	
2350	5-(hidroximetil)furfural	1,2 (12)	0,8 (14)	1,8 (18)	1,6 (12)	2,4 (6)	1,5 (12)	2,2 (7)	2,5 (10)	0,8 (12)	1,0 (13)	1,4 (11)	1,2 (12)	1,2 (12)	1,2 (12)	

RI	Família/Composto	1998			1999			2000					
		MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV	MB	MM	MS	MV
<i>(continuação)</i>													
	<i>Subtotal (Ac/Api)</i>	4,0	1,6	3,3	2,3	7,9	2,9	4,2	3,5	2,7	1,8	2,6	1,7
	<i>Subtotal (%)</i>	0,6	0,2	1,1	0,3	1,2	0,4	1,3	0,5	0,4	0,3	0,8	0,3
	TOTAL (Ac/Api)	1181,7	1096,4	339,2	1115,7	1152,9	1152,3	393,7	1117,9	1089,0	1110,5	360,5	1076,3
	<i>TOTAL sem 1-hexanol ((Ac/Api)</i>	697,7	653,6	283,2	676,0	663,9	715,2	326,9	692,0	637,2	637,3	298,7	631,7

*n=3; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 3. AA - Áreas médias* relativas, expressas em termos do padrão interno (octan-3-ol), dos compostos voláteis da fração livre do aroma dos vinhos nas diferentes variedades em estudo, agrupados por famílias químicas, extraídos por SPME com fibra de poliacrilato.

RI	Família/Composto	Boal		Malvazia		Sercial		Verdelho					
		1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000			
Terpenos													
1448	trans-óxido de linalol	0,3 (12)	0,2 (13)	0,3 (11)	1,8 (10)	2,0 (11)	1,6 (15)	nd	nd	nd	0,3 (12)	0,2 (8)	0,2 (6)
1476	cis-óxido de linalol	nd	nd	nd	0,8 (14)	0,6 (15)	0,7 (12)	nd	nd	0,1 (13)	0,3 (7)	0,3 (12)	0,3 (11)
1512	(E,E)-farnesal	nd	nd	nd	2,6 (12)	1,5 (11)	0,6 (14)	2,3 (10)	1,4 (4)	0,7 (10)	0,7 (8)	0,5 (7)	0,3 (5)
1555	linalol	12,0 (11)	11,4 (12)	10,6 (10)	10,5 (15)	11,9 (12)	9,7 (12)	17,8 (15)	16,3 (12)	16,0 (10)	6,7 (11)	7,2 (13)	6,5 (15)
1614	2,6-dimetilocta-1,7-dieno-3,6-diol	0,8 (15)	0,7 (6)	0,2 (13)	1,7 (11)	1,0 (12)	0,4 (9)	nd	nd	nd	0,5 (15)	0,4 (6)	0,2 (17)
1704	α-terpinol	0,4 (17)	0,4 (13)	0,5 (15)	2,0 (6)	1,9 (6)	1,8 (5)	0,7 (12)	0,8 (9)	0,6 (12)	1,2 (8)	1,2 (13)	1,2 (12)
1761	(+)-δ-cadineno	1,3 (9)	1,1 (17)	0,3 (12)	1,3 (8)	0,7 (9)	0,3 (11)	0,4 (11)	0,3 (15)	0,2 (17)	0,5 (8)	0,3 (8)	0,2 (11)
1785	citronelol	0,8 (10)	0,5 (15)	0,6 (10)	0,5 (11)	0,4 (5)	0,4 (12)	0,2 (10)	0,2 (13)	0,1 (11)	nd	0,1 (10)	nd
1813	des. 1 (93+121+136)	0,2 (13)	0,1 (11)	nd	1,4 (12)	0,8 (8)	0,3 (13)	0,1 (12)	0,1 (13)	nd	nd	nd	nd
1865	geranilacetona	4,5 (11)	4,3 (18)	4,5 (6)	8,4 (9)	6,8 (10)	7,4 (8)	11,7 (16)	10,4 (10)	10,9 (13)	1,9 (12)	2,1 (12)	1,9 (13)
2024	nerolidol	9,0 (12)	7,1 (8)	7,2 (9)	nd	nd	nd	4,0 (14)	6,2 (12)	4,1 (11)	nd	nd	nd
2039	des. 2 (93+121+136)	3,7 (8)	2,9 (9)	0,6 (7)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2112	cariofileno	nd	nd	nd	nd	nd	0,4 (9)	0,6 (12)	0,4 (15)	0,2 (13)	nd	nd	nd
2205	farnesol	3,7 (12)	3,1 (11)	2,9 (8)	1,2 (16)	1,2 (12)	1,0 (15)	0,2 (9)	0,1 (12)	0,2 (11)	5,7 (13)	5,9 (15)	4,7 (11)
2425	des. 3 (93+121+136)	nd	nd	nd	nd	nd	10,7 (10)	9,4 (14)	5,7 (13)	2,9 (15)	1,5 (12)	1,0 (11)	0,6 (8)
	Subtotal (Ac/Api)	36,7	31,8	27,8	81,2	55,9	35,3	47,4	41,9	35,8	19,3	19,2	16,4
	Subtotal (%)	3,3	2,9	3,4	6,9	4,5	3,7	6,4	5,8	3,8	1,4	1,5	1,4
Norisoprenóides em C₁₁													
1523	vitispirano I	2,0 (7)	2,2 (13)	2,2 (6)	0,6 (12)	0,6 (11)	0,6 (5)	0,7 (4)	1,0 (12)	0,6 (14)	0,5 (12)	0,6 (13)	0,6 (12)
1528	vitispirano II	1,2 (13)	1,5 (14)	1,4 (11)	0,3 (16)	0,3 (6)	0,3 (8)	0,4 (9)	0,4 (13)	0,3 (5)	nd	nd	nd
1744	TDN	0,7 (9)	0,8 (5)	1,1 (13)	0,2 (9)	0,2 (10)	0,2 (12)	0,3 (13)	0,3 (11)	0,2 (8)	0,5 (12)	0,5 (14)	0,4 (11)
1829	β-damascenona	2,0 (11)	2,3 (13)	2,4 (8)	4,2 (14)	4,1 (13)	4,2 (15)	1,9 (12)	1,4 (8)	1,8 (10)	2,1 (13)	2,2 (17)	2,1 (8)
2039	des. 4 (177+192)	0,1 (12)	0,1 (15)	nd	0,1 (11)	0,1 (12)	nd	0,4 (8)	0,5 (6)	0,3 (12)	0,2 (9)	0,3 (15)	0,2 (16)
	Subtotal (Ac/Api)	5,9	6,9	7,0	5,3	5,2	5,3	3,6	3,6	3,2	3,4	3,6	3,3

RI	Família/Composto	Boal		Malvazia		Sercial		Verdelho					
		1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000			
<i>(continuação)</i>													
Ácidos gordos voláteis													
1454	ácido acético	16,0 (9)	15,9 (7)	16,3 (12)	26,7 (18)	27,1 (15)	27,5 (11)	20,0 (10)	20,5 (12)	27,1 (9)	15,1 (6)	17,2 (14)	19,1 (16)
1542	ácido propanóico	1,1 (12)	0,1 (13)	0,1 (9)	0,3 (10)	0,4 (12)	0,4 (13)	0,2 (16)	0,2 (8)	0,2 (8)	0,2 (14)	0,2 (12)	0,2 (15)
1570	ácido dimetilmalónico	2,6 (15)	1,9 (8)	2,1 (6)	1,5 (9)	2,3 (11)	1,7 (10)	2,3 (15)	1,9 (13)	2,4 (14)	0,8 (8)	0,7 (8)	0,9 (11)
1629	ácido butanóico	2,2 (9)	1,1 (9)	1,6 (15)	1,5 (11)	2,0 (11)	1,9 (10)	0,7 (12)	1,1 (15)	1,3 (12)	0,9 (9)	0,6 (7)	1,4 (15)
1671	ácido 3-metilbutanóico	1,8 (7)	0,8 (6)	1,2 (11)	1,7 (13)	1,7 (13)	1,5 (9)	1,1 (7)	1,0 (8)	1,2 (10)	0,6 (12)	1,0 (9)	0,6 (12)
1724	ácido 2-hidroxi-benzenopropanóico	2,4 (8)	1,6 (5)	2,7 (9)	4,0 (12)	3,0 (15)	4,5 (5)	1,7 (16)	1,1 (11)	1,3 (15)	0,2 (8)	0,2 (16)	0,4 (13)
1860	ácido hexanóico	1,9 (12)	1,3 (7)	1,7 (7)	6,3 (8)	5,9 (8)	9,0 (13)	4,2 (11)	5,8 (9)	7,7 (7)	19,5 (8)	27,8 (11)	24,4 (11)
1953	ácido 2-etil-hexanóico	1,1 (15)	0,1 (14)	0,1 (7)	0,5 (15)	0,2 (6)	0,4 (8)	0,1 (13)	0,1 (12)	0,1 (13)	0,1 (13)	0,1 (19)	0,2 (17)
2042	ácido octanóico	1,0 (6)	0,1 (15)	0,1 (12)	3,2 (9)	3,5 (16)	3,8 (11)	16,2 (10)	18,6 (11)	22,6 (6)	21,4 (15)	18,4 (12)	15,2 (9)
2115	ácido nonanóico	1,0 (13)	0,1 (9)	1,0 (124)	0,1 (10)	0,2 (7)	0,3 (13)	0,3 (17)	0,4 (14)	0,5 (9)	0,2 (11)	0,2 (14)	0,4 (13)
2198	ácido decanóico	3,0 (8)	1,9 (11)	3,2 (8)	2,9 (12)	3,1 (15)	2,5 (6)	4,5 (11)	3,8 (10)	4,7 (5)	2,3 (9)	2,1 (12)	3,0 (12)
2308	ácido benzóico	3,3 (17)	2,3 (11)	4,0 (13)	4,0 (14)	3,7 (10)	3,4 (12)	0,8 (9)	0,7 (13)	0,8 (14)	0,5 (12)	0,4 (13)	0,7 (18)
2342	ácido dodecanóico	1,6 (14)	0,4 (8)	1,2 (10)	1,6 (13)	1,2 (13)	1,8 (12)	0,4 (14)	0,5 (8)	0,6 (11)	0,5 (10)	0,6 (15)	0,3 (11)
2461	ácido tetradecanóico	3,3 (9)	4,5 (12)	6,9 (12)	2,4 (11)	7,6 (12)	11,2 (9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Subtotal (Ac/Api)	42,2	32,3	42,3	56,6	61,8	69,8	52,5	55,7	70,5	62,4	69,6	66,7
	Subtotal (%)	3,8	2,9	5,2	4,8	5,0	7,3	7,1	7,7	7,5	4,4	5,4	5,6
Ésteres etílicos de ácidos gordos													
1039	acetato de etilo												
1239	hexanoato de etilo	5,1 (5)	4,7 (11)	4,8 (7)	5,6 (12)	8,8 (19)	8,2 (7)	22,6 (6)	16,9 (13)	15,5 (10)	34,0 (8)	36,0 (10)	30,8 (11)
1436	octanoato de etilo	14,9 (12)	14,5 (10)	12,8 (14)	57,3 (11)	50,8 (12)	50,3 (13)	80,2 (13)	59,7 (12)	54,9 (13)	226,3 (13)	151,7 (8)	230,4 (14)
1537	nonanoato de etilo	3,3 (8)	2,9 (16)	2,3 (12)	1,6 (15)	0,9 (10)	1,5 (8)	0,8 (9)	0,5 (10)	0,5 (11)	1,7 (11)	1,1 (16)	1,0 (13)
1636	decanoato de etilo	53,9 (14)	48,4 (9)	42,9 (11)	273,1 (9)	282,5 (9)	150,7 (12)	63,5 (11)	70,0 (5)	64,3 (12)	318,3 (10)	215,6 (12)	286,5 (11)
1662	benzoato de etilo	0,4 (10)	0,5 (8)	0,5 (16)	0,6 (12)	0,4 (17)	0,4 (11)	0,4 (8)	0,3 (9)	0,3 (8)	0,4 (11)	0,2 (11)	0,4 (15)
1693	cis-9-decanoato de etilo	0,3 (15)	0,3 (9)	0,3 (9)	6,2 (13)	3,7 (13)	2,0 (14)	13,2 (12)	9,8 (6)	9,0 (15)	25,7 (7)	23,8 (15)	25,9 (9)
1796	benzenoacetato de etilo	1,4 (13)	1,7 (11)	1,7 (8)	3,7 (11)	2,2 (12)	4,2 (7)	0,8 (15)	0,6 (14)	0,6 (12)	1,1 (15)	0,7 (14)	1,4 (6)
1855	dodecanoato de etilo	5,9 (12)	9,1 (14)	8,1 (15)	31,4 (14)	25,2 (15)	26,0 (10)	12,0 (11)	14,0 (7)	9,2 (9)	20,5 (12)	27,1 (11)	23,7 (10)

RI	Família/Composto	Boal		Malvazia			Sercial		Verdelho				
		1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000			
	(continuação)												
2029	tetradecanoato de etilo	2,5 (12)	1,7 (11)	1,9 (12)	10,0 (15)	9,3 (12)	13,2 (13)	3,3 (12)	2,5 (10)	2,3 (11)	7,6 (10)	5,0 (13)	7,0 (11)
2180	hexadecanoato de etilo	8,3 (14)	7,6 (13)	6,8 (8)	40,8 (10)	34,3 (9)	33,0 (8)	23,3 (15)	17,4 (7)	25,9 (12)	13,7 (15)	15,8 (14)	13,9 (11)
2365	7,10-octadecadienoato de metilo	1,2 (11)	1,2 (10)	1,1 (13)	6,8 (6)	5,8 (7)	7,1 (12)	1,7 (13)	1,2 (9)	1,2 (8)	1,8 (10)	1,2 (12)	1,1 (10)
	Subtotal (Ac/Api)	97,2	92,6	83,1	436,8	423,8	296,7	221,7	192,9	183,7	651,1	478,3	622,1
	Subtotal (%)	8,7	8,4	10,2	37,1	34,4	31,1	29,8	26,8	19,7	46,3	37,1	52,4
	Ésteres etílicos de ácidos fixos												
1353	lactato de etilo	29,9 (14)	19,6 (11)	26,7 (10)	33,3 (12)	29,9 (8)	31,0 (7)	63,3 (9)	47,6 (12)	61,7 (13)	8,0 (6)	7,2 (8)	7,1 (12)
1432	2-hidroxi-3-metilbutanoato de etilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5 (13)	0,4 (9)	0,4 (14)	nd	nd	nd
1509	2-hidroxipropanoato de etilo	nd	nd	nd	0,7 (12)	0,6 (8)	0,2 (10)	0,3 (13)	0,3 (11)	0,3 (9)	0,5 (6)	0,4 (7)	0,3 (7)
1680	succinato de dietilo	nd	nd	nd	8,2 (10)	7,5 (9)	2,4 (12)	1,6 (15)	1,2 (13)	1,3 (8)	1,5 (10)	1,4 (11)	0,9 (12)
2019	miristato de isopropilo	10,2 (11)	10,5 (12)	10,2 (15)	25,2 (8)	22,8 (10)	26,4 (15)	7,1 (16)	6,1 (12)	6,6 (14)	4,0 (10)	3,4 (6)	2,5 (13)
2025	3-hidroxihexanoato de etilo	0,5 (12)	0,4 (10)	0,2 (11)	1,3 (12)	1,2 (10)	0,4 (9)	0,7 (6)	0,5 (8)	0,6 (9)	0,2 (11)	0,2 (12)	0,2 (17)
	Subtotal (Ac/Api)	40,6	30,5	37,1	68,7	62,0	60,3	73,7	56,1	70,9	14,2	12,7	11,1
	Subtotal (%)	3,6	2,8	4,5	5,8	5,0	6,3	9,9	7,8	7,6	1,0	1,0	0,9
	Aldeídos/Cetonas												
1014	acetaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,4 (9)	1,0 (6)	0,9 (11)
1388	nonan-2-ona	31,3 (14)	27,2 (6)	32,8 (10)	14,6 (9)	11,7 (12)	15,4 (9)	7,3 (13)	5,1 (8)	7,8 (7)	3,2 (13)	3,3 (10)	2,9 (12)
1516	benzaldeído	nd	nd	nd	0,3 (12)	0,2 (13)	0,1 (14)	0,1 (7)	0,1 (11)	0,1 (8)	0,5 (12)	0,3 (10)	0,3 (7)
	Subtotal (Ac/Api)	31,3	27,2	32,8	14,9	11,9	15,6	7,4	5,2	7,9	5,1	4,7	4,0
	Subtotal (%)	2,8	2,5	4,0	1,3	1,0	1,6	1,0	0,7	0,8	0,4	0,4	0,3
	Fenóis voláteis												
1778	salicilato de metilo	0,4 (11)	0,5 (8)	0,3 (12)	0,2 (9)	0,3 (11)	0,1 (8)	0,1 (12)	0,1 (6)	0,1 (11)	nd	nd	nd
2012	4-metil-2-metoxifenol	nd	nd	nd	0,1 (8)	0,1 (13)	nd	0,6 (11)	0,9 (12)	0,7 (8)	0,2 (6)	0,3 (10)	0,2 (10)
2069	(1,1-dimetiltil)-2-metoxifenol	0,4 (17)	0,5 (10)	0,3 (6)	0,4 (12)	0,5 (7)	0,2 (5)	0,5 (13)	0,7 (9)	0,5 (7)	0,3 (11)	0,3 (12)	0,2 (7)

RI	Familia/Composto	Boal			Malvazia			Sercial			Verdelho		
		1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
2113	(continuação) eugenol	0,2 (13)	0,2 (12)	0,2 (8)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Subtotal (Ac/Api)	1,0	1,2	0,7	0,7	0,8	0,4	1,1	1,6	1,3	0,5	0,6	0,4
	Subtotal (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	nd	0,1	0,2	0,1	nd	nd	nd
	Compostos furânicos												
1466	furfural	0,7 (15)	0,5 (11)	0,5 (13)	0,4 (8)	0,3 (12)	0,5 (6)	0,1 (12)	0,2 (16)	0,2 (14)	0,5 (7)	0,3 (11)	0,4 (9)
1756	γ-butirolactona	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3 (12)	0,3 (15)	0,3 (8)
1934	pantolactona	0,6 (12)	0,5 (6)	0,7 (9)	1,5 (15)	1,0 (10)	0,7 (13)	0,6 (10)	0,4 (8)	0,6 (10)	4,3 (13)	3,5 (12)	2,6 (11)
2128	5-(acetoximetil)furfural	0,5 (9)	0,3 (14)	0,5 (12)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2 (15)	0,2 (14)	0,1 (12)
2350	5-(hidroximetil)furfural	nd	nd	nd	0,2 (11)	0,2 (13)	0,1 (15)	0,1 (11)	0,1 (12)	0,1 (15)	0,1 (8)	0,1 (9)	0,1 (8)
	Subtotal (Ac/Api)	1,9	1,4	1,7	2,1	1,5	1,3	0,8	0,7	0,9	5,5	4,4	3,4
	Subtotal (%)	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3
	TOTAL (Ac/Api)	1118,6	1099,0	816,5	1177,9	1230,6	953,5	743,3	719,7	934,5	1406,1	1287,9	1186,2

*n=3; nd: não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 4. AA Áreas médias* relativas (Ac/A_{pi}), expressas em função do octan-3-ol, para os principais ésteres etílicos dos ácidos fixos obtidas por HS-SPME.

Ésteres etílicos de ácidos fixos (Ac/A _{pi})	VB			VM			VS			VV		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
lactato de etilo	29,9	19,6	26,7	33,3	29,9	31,0	63,3	47,6	61,7	8,0	7,2	7,1
3-hidroxihexanoato de etilo	nd	nd	nd	8,2	7,5	2,4	1,6	1,2	1,3	1,5	1,4	0,9
succinato de dietilo	10,2	10,5	10,2	25,2	22,8	26,4	7,1	6,1	6,6	4,0	3,4	2,5
miristato de etilo	0,5	0,4	0,2	1,3	1,2	0,4	0,7	0,5	0,6	0,2	0,2	0,2

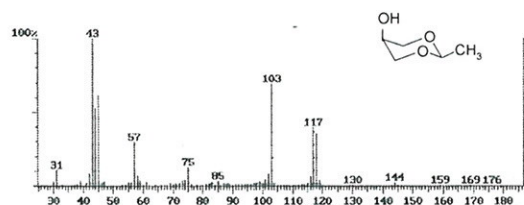
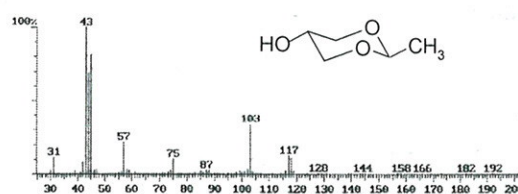
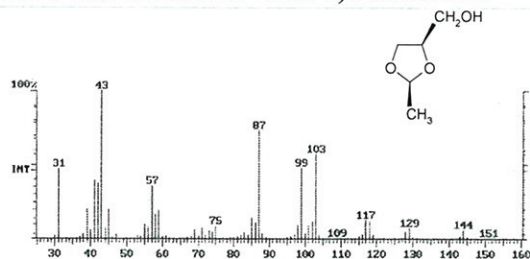
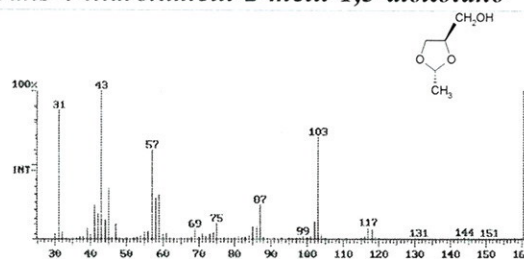
*n=3; nd – não detectado nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 6.AA Valores médios encontrados para os principais ésteres etílicos dos ácidos gordos.

Ésteres etílicos de ácidos gordos (Ac/Api)	VB			VM			VS			VV		
	Min.	Máx.	\bar{X} (n=26)	Min.	Máx.	\bar{X} (n=22)	Min.	Máx.	\bar{X} (n=17)	Min.	Máx.	\bar{X} (n=21)
hexanoato de etilo	0,5	0,8	0,7	0,3	1,0	0,6	0,6	2,1	1,2	0,3	0,9	0,6
2-oxopentanoato de etilo	0,2	9,6	2,0	0,8	8,6	2,2	0,2	5,7	2,4	0,2	6,6	3,3
2-hidroxibenzoato de etilo	0,009	0,05	0,02	0,009	0,05	0,03	0,02	0,9	0,09	0,002	0,04	0,02
4-hidroxibutanoato de etilo	0,2	1,8	0,6	0,2	1,7	0,7	0,3	4,7	1,3	0,2	3,7	1,0
levulinato de etilo	0,1	5,6	1,5	0,0	4,1	3,3	0,5	8,0	1,8	0,1	8,6	2,5
HMBE*	0,03	1,9	0,4	0,05	1,7	0,5	0,03	3,9	0,9	0,01	2,2	0,7
octanoato de etilo	0,05	0,9	0,3	0,2	1,0	0,4	0,2	1,2	0,6	0,09	1,1	0,5
decanoato de etilo	0,06	0,5	0,2	0,05	0,3	0,2	0,02	0,1	0,05	0,03	0,08	0,05
2-hidroxihexanoato de etilo	0,02	3,9	0,8	0,03		0,8	0,03	5,9	1,6	0,3	2,5	1,4

*HMBE – 2-hidroxi-3-metilbutanoato de etilo

Tabela 7. AA Espectros de massa e estrutura molecular dos acetais analisados.

Cis-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano*Trans-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano**Cis-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano**Trans-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano*

ANEXO B

Dados referentes à aplicação da análise multivariável aos compostos monoterpênicos e voláteis dos mostos e vinhos

Tabela 1. AB	Concentração dos compostos varietais livres matriz MostosVarietais	289
Tabela 2. AB	Matriz dos pesos factoriais dos componentes rodados obtidos da aplicação da PCA à matriz MostosVarietais	290
Tabela 3. AB	Teste das comparações múltiplas LSD entre castas	290
Tabela 4. AB	Teste das comparações múltiplas LSD aplicado aos anos de vindima	291
Tabela 5. AB	Coefficientes das três funções discriminantes resultantes da aplicação da LDA à matriz MostosVarietais	291
Tabela 6. AB	Capacidade de classificação das variáveis	292
Tabela 7. AB	Matriz VinhosTerpenóis (concentrações expressas em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	293
Tabela 8. AB	Matriz dos pesos factoriais dos componentes rodados, obtidos da aplicação da PCA à matriz VinhosVarietais	294
Tabela 9. AB	Análise de variância aplicada aos dois primeiros componentes principais resultantes da aplicação da PCA à matriz Vinhos Varietais	294
Tabela 10. AB	Coefficientes das três funções discriminantes resultantes da aplicação da LDA à matriz MostosVarietais	295
Tabela 11. AB	Capacidade de classificação das variáveis da matriz Vinhos Varietais	295
Tabela 12. AB	Matriz ÁlcooisSuperiores (áreas relativas expressas em função do padrão interno)	296
Tabela 13. AB	Matriz ÁcidosGordos (áreas relativas expressas em função do padrão interno)	297
Tabela 14. AB	MatrizÉsteres (áreas relativas expressas em função do padrão interno)	298
Tabela 15. AB	MatrizCompostosCarbonilados (áreas relativas expressas em função do padrão interno)	299

A identificação das variáveis das tabelas 1. AB e 7. AB encontram-se na tabela 3.25 (pág. 214).

A identificação das variáveis das tabelas 12. AB - 15. AB encontram-se na tabela 3.30 (pág. 226).

Tabela I. AB Concentração dos compostos varietais livres - Matriz Mostos Varietais.

Casta	Amostra	Ano	Concentração (µg/L)									
			lin	ter	cit	dam	ner	ger	ter4ol	neral	ion	far
Boal	MB98-1	1998	2,2	3,3	0,3	2,1	3,1	2,0	5,7	nd	3,4	58,4
	MB98-2	1998	3,1	4,2	0,3	1,9	4,2	1,6	5,2	nd	3,0	50,1
	MB98-3	1998	2,8	3,8	0,4	2,2	3,9	2,1	4,7	nd	4,2	47,4
	MB99-1	1999	3,2	3,8	0,5	1,1	2,1	1,2	4,1	nd	4,9	53,4
	MB99-2	1999	3,8	3,8	0,3	1,9	3,8	1,9	5,6	nd	3,6	45,9
	MB99-3	1999	4,4	4,2	0,4	1,1	2,8	2,2	5,1	nd	3,0	50,2
	MB00-1	2000	3,9	4,5	0,5	3,5	3,9	2,5	4,3	nd	4,6	48,2
	MB00-2	2000	4,0	5,2	0,5	2,6	2,8	2,9	6,8	nd	2,4	53,8
	MB00-3	2000	4,5	5,1	0,4	1,4	3,5	3,4	6,2	nd	4,2	57,1
Malvazia	MM98-1	1998	42,5	27,7	0,1	9,2	nd	3,5	1,0	10,9	1,9	41,2
	MM98-2	1998	46,3	28,2	0,2	10,4	nd	4,0	1,9	9,1	2,3	36,9
	MM98-3	1998	40,4	26,2	0,2	7,5	nd	4,2	2,5	8,4	1,5	33,7
	MM99-1	1999	58,2	24,4	0,4	8,3	1,3	3,6	1,4	12,0	2,4	33,8
	MM99-2	1999	53,2	23,2	0,3	7,7	2,6	3,0	1,1	7,3	2,7	36,2
	MM99-3	1999	52,2	25,7	0,2	6,9	1,7	4,4	1,8	9,1	2,6	38,3
	MM00-1	2000	31,3	18,4	0,3	9,6	2,0	5,0	2,2	9,4	1,8	38,3
	MM00-2	2000	34,1	19,9	0,3	8,5	2,8	5,1	1,3	8,7	2,8	32,7
	MM00-3	2000	37,5	20,5	0,2	9,5	3,0	4,1	1,3	6,9	1,7	41,4
Sercial	MS98-1	1998	20,4	7,3	0,2	2,2	4,0	2,5	5,8	nd	3,8	18,3
	MS98-2	1998	22,6	7,9	0,2	2,0	3,2	2,7	5,1	nd	4,8	15,3
	MS98-3	1998	19,1	6,5	0,3	2,5	3,2	2,9	6,2	nd	5,1	13,7
	MS99-1	1999	18,5	7,6	0,3	2,8	4,6	2,0	5,2	nd	4,7	20,3
	MS99-2	1999	17,6	8,5	0,2	2,4	3,4	1,8	4,9	nd	4,7	14,4
	MS99-3	1999	17,9	9,1	0,3	3,1	3,9	2,1	6,4	nd	4,9	12,0
	MS00-1	2000	21,4	6,2	0,4	1,6	3,0	3,4	4,8	nd	4,2	12,8
	MS00-2	2000	24,2	8,5	0,5	1,9	4,7	2,9	5,3	nd	5,1	19,7
	MS00-3	2000	25,8	7,9	0,6	1,7	3,8	1,7	5,7	nd	4,8	16,1
Verdelho	MV98-1	1998	8,4	11,0	0,6	4,6	0,9	5,7	6,1	nd	9,7	24,2
	MV98-2	1998	7,1	11,8	0,6	4,1	0,9	6,0	8,5	nd	8,2	17,9
	MV98-3	1998	9,2	12,2	0,7	5,2	0,8	6,7	7,6	nd	7,3	23,8
	MV99-1	1999	12,4	13,2	0,7	5,2	1,0	5,4	9,1	nd	8,5	24,4
	MV99-2	1999	10,8	13,1	0,8	5,4	0,9	6,3	8,1	nd	7,1	20,9
	MV99-3	1999	9,2	12,8	0,8	5,7	1,0	5,0	6,1	nd	9,2	18,2
	MV00-1	2000	7,9	14,0	0,7	4,9	0,9	5,4	6,8	nd	8,4	19,3
	MV00-2	2000	6,9	12,9	0,8	4,6	1,4	6,9	8,3	nd	8,9	18,7
	MV00-3	2000	9,7	13,2	0,8	5,8	1,5	6,9	7,1	nd	7,6	24,9

Tabela 2. AB *Matriz dos pesos factoriais dos componentes rodados.*

Rotated Component Matrix^a

	Component	
	1	2
ter	,982	2,449E-02
dam	,958	,111
neral	,922	-,332
lin	,852	-,362
cit	-,243	,907
ion	-,326	,885
ger	,452	,838

Extraction Method: Principal Component Analysis.
Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

a. Rotation converged in 3 iterations.

Tabela 3. AB *Teste das comparações múltiplas LSD entre castas.*

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) casta1	(J) casta1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
1º Componente principal	VB	VM	-2,5595315*	,06861167	,000	-2,6992889	-2,4197741
		VS	-,9903740*	,06861167	,000	-1,1301314	-,8506166
		VV	-,3815243*	,06861167	,000	-,5212817	-,2417669
	VM	VB	2,5595315*	,06861167	,000	2,4197741	2,6992889
		VS	1,5691575*	,06861167	,000	1,4294001	1,7089149
		VV	2,1780072*	,06861167	,000	2,0382498	2,3177646
	VS	VB	,9903740*	,06861167	,000	,8506166	1,1301314
		VM	-1,5691575*	,06861167	,000	-1,7089149	-1,4294001
		VV	,6088497*	,06861167	,000	,4690923	,7486071
	VV	VB	,3815243*	,06861167	,000	,2417669	,5212817
		VM	-2,1780072*	,06861167	,000	-2,3177646	-2,0382498
		VS	-,6088497*	,06861167	,000	-,7486071	-,4690923
2º componente principal	VB	VM	-,0016082	,11822287	,989	-,2424203	,2392039
		VS	-2,2339524*	,11822287	,000	-2,4747645	-1,9931403
		VV	-,0712660	,11822287	,551	-,3120781	,1695461
	VM	VB	,0016082	,11822287	,989	-,2392039	,2424203
		VS	-2,2323442*	,11822287	,000	-2,4731563	-1,9915321
		VV	-,0696577	,11822287	,560	-,3104698	,1711544
	VS	VB	2,2339524*	,11822287	,000	1,9931403	2,4747645
		VM	2,2323442*	,11822287	,000	1,9915321	2,4731563
		VV	2,1626864*	,11822287	,000	1,9218743	2,4034985
	VV	VB	,0712660	,11822287	,551	-,1695461	,3120781
		VM	,0696577	,11822287	,560	-,1711544	,3104698
		VS	-2,1626864*	,11822287	,000	-2,4034985	-1,9218743

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabela 4. AB Teste das comparações múltiplas LSD aplicado aos anos de vindima.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: casta1

LSD

(I) ano	(J) ano	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1998,00	1999,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699
	2000,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699
1999,00	1998,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699
	2000,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699
2000,00	1998,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699
	1999,00	,0000	,47673	1,000	-,9699	,9699

Tabela 5. AB Coeficientes das três funções discriminantes resultantes da aplicação da LDA à matriz *MostosVarietais*.

Structure Matrix

	Function		
	1	2	3
neral	,623*	,040	-,594
ter	,382*	,275	-,073
ion	-,232	,405*	,338
ger	,017	,397*	-,249
cit	-,128	,231*	-,154
lin	,370	,022	,688*
dam	,331	,317	-,365*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions
Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

Tabela 6. AB – Capacidade de classificação das variáveis.

Classification Results^{b,c}

		casta1	Predicted Group Membership				Total
			VB	VM	VS	VV	
Original	Count	VB	7	0	0	0	7
		VM	0	7	0	0	7
		VS	0	0	7	0	7
		VV	0	0	0	7	7
		Ungrouped cases	2	2	2	2	8
	%	VB	100,0	,0	,0	,0	100,0
		VM	,0	100,0	,0	,0	100,0
		VS	,0	,0	100,0	,0	100,0
		VV	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Ungrouped cases	25,0	25,0	25,0	25,0	100,0
Cross-validated ^a	Count	VB	7	0	0	0	7
		VM	0	7	0	0	7
		VS	0	0	7	0	7
		VV	0	0	0	7	7
		Ungrouped cases	2	2	2	2	8
	%	VB	100,0	,0	,0	,0	100,0
		VM	,0	100,0	,0	,0	100,0
		VS	,0	,0	100,0	,0	100,0
		VV	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Ungrouped cases	25,0	25,0	25,0	25,0	100,0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 100,0% of original grouped cases correctly classified.

c. 100,0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Tabela 7. AB Matriz Vinhos Terpenóis (concentrações $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Casta	Amostra	Ano	tlinox	clinox	efar	lin	ter	cit	neril	nero	far	vitis I	vitis	TDN	dam	
Boal	VB98-1	1998	0,2	nd	nd	10,1	3,0	15,5	2,2	3,6	4,6	2,8	2,0	1,1	6,6	
	VB98-2	1998	0,3	nd	nd	8,6	2,7	13,8	2,9	3,2	4,9	2,5	1,8	1,0	5,9	
	VB98-3	1998	0,2	nd	nd	10,8	3,0	14,2	2,1	2,9	4,2	2,2	1,5	0,8	6,0	
	VB99-1	1999	0,2	nd	nd	9,6	2,7	8,4	2,3	2,7	3,3	2,7	1,9	1,0	6,4	
	VB99-2	1999	0,2	nd	nd	8,8	3,9	9,8	1,9	3,1	4,4	3,3	2,3	1,3	7,1	
	VB99-3	1999	0,3	nd	nd	9,2	2,6	10,6	2,7	1,9	3,9	3,0	2,1	1,2	6,9	
	VB00-1	2000	0,2	nd	nd	10,4	3,8	11,0	1,9	2,7	2,6	2,6	3,8	2,8	1,4	7,2
	VB00-2	2000	0,2	nd	nd	8,4	3,7	12,4	2,4	2,9	4,4	4,4	1,8	1,7	7,9	
	VB00-3	2000	0,2	nd	nd	7,4	3,2	12,9	2,9	2,8	3,6	3,6	2,8	1,7	1,4	6,2
Malvazia	VV98-1	1998	1,3	0,7	23,5	8,5	14,3	9,2	4,0	nd	2,0	0,7	0,4	0,2	13,9	
	VV98-2	1998	1,4	0,8	25,0	7,9	13,2	9,8	4,8	nd	1,1	0,8	0,5	0,2	11,8	
	VV98-3	1998	1,8	0,5	28,8	9,6	14,8	8,5	4,7	nd	1,5	0,7	0,4	0,2	12,9	
	VV99-1	1999	1,8	0,4	33,6	10,6	12,0	7,9	3,1	nd	1,6	0,8	0,5	0,2	12,4	
	VV99-2	1999	1,8	0,6	32,0	9,2	14,5	8,9	3,8	nd	1,5	0,8	0,4	0,2	12,7	
	VV99-3	1999	1,8	0,5	22,8	9,8	13,6	7,2	4,1	nd	1,5	0,8	0,5	0,2	11,9	
	VV00-1	2000	1,8	0,6	28,7	8,7	13,2	7,4	3,5	nd	1,0	1,0	0,6	0,5	0,2	13,5
	VV00-2	2000	1,1	0,6	26,4	7,3	11,5	8,3	4,0	nd	1,1	1,1	0,9	0,4	0,3	11,9
	VV00-3	2000	1,1	0,6	25,5	8,1	12,8	7,9	4,5	nd	1,0	1,0	0,9	0,3	0,2	12,8
	VS98-1	1998	nd	nd	29,3	14,8	5,6	3,8	6,6	1,1	0,2	0,2	0,7	0,5	0,3	5,2
	VS98-2	1998	nd	nd	33,4	15,8	4,7	3,7	5,9	1,5	0,3	0,3	1,0	0,6	0,4	6,4
	VS98-3	1998	nd	nd	26,3	13,3	3,9	4,1	6,3	1,8	0,3	0,3	0,8	0,5	0,4	5,8
Sercial	VS99-1	1999	nd	nd	34,3	14,5	6,2	3,0	6,0	2,6	0,1	0,9	0,6	0,4	4,4	
	VS99-2	1999	nd	nd	27,6	13,2	5,4	3,5	5,8	2,2	0,2	1,2	0,8	0,5	3,7	
	VS99-3	1999	nd	nd	31,0	12,8	4,6	3,5	5,0	1,9	0,2	1,1	0,7	0,5	4,9	
	VS00-1	2000	nd	nd	30,5	13,1	3,4	2,5	5,5	1,4	0,2	0,2	0,8	0,4	5,6	
	VS00-2	2000	nd	0,1	27,1	12,6	3,9	2,9	5,7	1,6	0,2	0,2	0,8	0,6	4,7	
	VS00-3	2000	nd	0,0	33,3	13,8	4,7	2,8	6,2	1,5	0,2	0,2	0,7	0,5	5,9	
	VV98-1	1998	0,2	0,3	11,1	5,8	9,2	0,9	0,8	nd	7,5	0,6	0,6	nd	0,6	5,9
	VV98-2	1998	0,3	0,1	18,2	5,0	9,7	1,0	0,9	nd	5,6	0,8	0,8	nd	0,7	7,3
	VV98-3	1998	0,17	0,35	14,64	5,83	7,16	0,79	1,34	nd	7,57	0,67	nd	0,64	6,1	
Verdelho	VV99-1	1999	0,16	0,2	13,54	7,24	8,75	1,31	1,56	nd	6,17	0,71	nd	0,68	7,61	
	VV99-2	1999	0,23	0,29	13,74	5,31	9,35	0,89	0,86	nd	8,09	0,82	nd	0,79	5,31	
	VV99-3	1999	0,19	0,25	13,64	5,19	7,89	0,79	0,92	nd	7,13	0,77	nd	0,73	6,64	
	VV00-1	2000	0,1	0,36	10,17	4,96	8,71	1,02	0,84	nd	6,14	0,75	nd	0,65	6,24	
	VV00-2	2000	0,26	0,22	16,81	5,13	9,42	0,85	1,21	nd	7,11	0,87	nd	0,54	7,3	
	VV00-3	2000	0,23	0,18	13,49	6,1	7,81	0,94	0,96	nd	4,13	0,55	nd	0,5	5,8	

Tabela 8. AB *Matriz dos pesos factoriais dos componentes rodados, obtidos da aplicação da PCA à matriz VinhosVarietais.*

Rotated Component Matrix^a

	Component	
	1	2
ter	,960	-5,16E-02
nero	-,926	,132
tlinox	,920	-,104
vitis1	-,756	-,300
dam	,735	-1,55E-02
tdn	-,731	-,587
ger	-8,30E-03	,966
far	-3,31E-02	-,920
lin	-,374	,898
efar	,568	,762

Extraction Method: Principal Component Analysis.
Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

a. Rotation converged in 3 iterations.

Tabela 9. AB *Análise de variância aplicada aos dois primeiros componentes principais resultantes da aplicação da PCA à matriz VinhosVarietais.*

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1º Componente principal	Between Groups	28,118	3	9,373	43,582	,000
	Within Groups	6,882	32	,215		
	Total	35,000	35			
2º componente principal	Between Groups	33,454	3	11,151	230,869	,000
	Within Groups	1,546	32	,048		
	Total	35,000	35			

Tabela 10. AB Coeficientes das três funções discriminantes resultantes da aplicação da LDA à matriz MostosVarietais.

Structure Matrix

	Function		
	1	2	3
ger	,341*	,234	,051
lin	,259*	,033	-,001
efar	,147	,421*	-,349
ter	-,203	,398*	,180
tdn	-,043	-,286*	,099
nero	,176	-,260*	,213
dam	-,120	,273	,600*
vitis1	,037	-,288	,447*
far	-,306	-,219	-,311*
tlinox	-,148	,255	,262*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions
Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

Tabela 11. AB Capacidade de classificação das variáveis da matriz VinhosVarietais.

Classification Results^{b,c}

			Predicted Group Membership				Total
			VB	VM	VS	VV	
Original	Count	casta1 VB	7	0	0	0	7
		VM	0	7	0	0	7
		VS	0	0	7	0	7
		VV	0	0	0	7	7
		Ungrouped cases	2	2	2	2	8
	%	VB	100,0	,0	,0	,0	100,0
		VM	,0	100,0	,0	,0	100,0
		VS	,0	,0	100,0	,0	100,0
		VV	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Ungrouped cases	25,0	25,0	25,0	25,0	100,0
Cross-validated ^a	Count	casta1 VB	7	0	0	0	7
		VM	0	7	0	0	7
		VS	0	0	7	0	7
		VV	0	0	0	7	7
		Ungrouped cases	2	2	2	2	8
	%	VB	100,0	,0	,0	,0	100,0
		VM	,0	100,0	,0	,0	100,0
		VS	,0	,0	100,0	,0	100,0
		VV	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Ungrouped cases	25,0	25,0	25,0	25,0	100,0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 100,0% of original grouped cases correctly classified.

c. 100,0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Tabela 12. AB Matriz Alcoois Superiores (áreas relativas expressas em função do padrão interno).

Casta	Amostra	Ano	prop	mprop	mbut	but	hex	e3hex	z3hex	e2hex	z2hex	albenz	feoh	
Boal	VB98-1	1998	9,3	15,7	25,3	387,8	558,5	8,1	9,3	1,7	1,3	216,1	3897,4	
	VB98-2	1998	11,4	16,3	28,8	412,7	551,3	12,4	13,2	3,1	2,5	284,2	2941,6	
	VB98-3	1998	10,2	16,9	27,5	402,3	544,9	10,6	11,6	2,2	1,6	252,2	3499,5	
	VB99-1	1999	14,6	19,4	29,7	489,0	533,3	21,1	12,5	1,5	3,3	302,3	3338,0	
	VB99-2	1999	12,2	16,3	31,7	323,0	507,0	19,1	14,2	2,1	1,6	291,4	3451,0	
	VB99-3	1999	13,1	17,5	30,1	404,0	510,2	20,8	13,0	1,7	2,2	292,9	3384,5	
	VB00-1	2000	12,9	17,3	34,6	426,4	513,8	17,4	11,6	1,9	2,9	263,6	3835,3	
	VB00-2	2000	14,3	16,2	28,4	361,9	656,7	16,1	12,4	3,2	2,0	2,0	251,2	3912,4
	VB00-3	2000	13,2	16,9	31,3	391,2	582,3	16,5	12,6	2,2	2,2	2,1	255,5	3870,9
	VV98-1	1998	21,6	41,4	19,8	308,4	432,4	3,8	139,9	3,8	nd	nd	56,4	1433,9
VV98-2	1998	24,7	37,2	23,1	328,1	489,7	4,2	127,4	3,1	nd	nd	67,3	1491,8	
VV98-3	1998	23,5	39,4	21,4	318,2	461,4	4,8	133,1	3,4	nd	nd	61,3	1465,5	
VV99-1	1999	29,7	36,3	25,6	285,4	558,2	4,9	144,8	4,9	nd	nd	72,8	2050,8	
VV99-2	1999	28,1	40,3	28,4	291,0	504,7	3,6	130,5	4,2	nd	nd	61,9	1732,3	
VV99-3	1999	28,3	38,6	27,8	286,2	536,5	4,5	137,6	4,2	nd	nd	67,3	1893,6	
VV00-1	2000	25,8	49,4	22,3	347,1	486,7	4,3	125,0	4,3	nd	nd	63,4	1564,6	
VV00-2	2000	22,5	41,9	23,6	321,4	456,2	3,6	119,3	4,9	nd	nd	56,1	1356,9	
VV00-3	2000	24,5	45,5	22,5	334,2	471,4	4,0	122,5	4,9	nd	nd	59,7	1461,8	
VS98-1	1998	33,7	65,8	19,6	288,7	223,3	4,1	28,4	nd	nd	1,1	27,5	1147,8	
VS98-2	1998	27,1	70,3	24,1	256,9	211,7	3,4	23,1	nd	nd	0,8	26,2	1092,8	
VS98-3	1998	30,1	68,5	21,8	272,1	217,9	3,7	25,3	nd	nd	1,0	26,8	1122,3	
VS99-1	1999	24,5	60,9	16,1	212,0	170,9	2,4	24,5	nd	nd	0,6	20,5	1116,5	
VS99-2	1999	27,2	68,7	21,4	203,1	193,7	3,1	22,4	nd	nd	0,8	24,5	934,6	
VS99-3	1999	25,5	64,2	18,7	207,9	181,3	2,7	23,9	nd	nd	0,6	22,2	1025,9	
VS00-1	2000	31,3	72,4	24,1	284,8	249,0	2,1	23,5	nd	nd	0,8	27,9	951,8	
VS00-2	2000	26,2	71,0	17,2	231,7	173,2	2,8	26,7	nd	nd	0,9	21,5	892,6	
VS00-3	2000	28,7	71,1	20,6	258,9	211,6	2,4	25,8	nd	nd	0,8	24,5	922,9	
VV98-1	1998	19,2	38,4	26,1	296,2	375,9	5,4	23,5	nd	nd	nd	32,8	963,1	
VV98-2	1998	17,1	32,7	23,5	271,0	400,7	6,8	27,9	nd	nd	nd	28,3	894,7	
VV98-3	1998	18,5	35,9	24,2	283,2	388,5	6,9	25,5	nd	nd	nd	30,2	928,2	
VV99-1	1999	14,7	34,1	36,6	311,1	393,7	9,6	36,5	nd	nd	nd	40,8	941,1	
VV99-2	1999	16,3	29,3	34,2	278,4	369,0	7,3	27,1	nd	nd	nd	31,6	903,6	
VV99-3	1999	15,3	31,3	35,5	294,7	381,3	8,4	31,2	nd	nd	nd	36,7	920,4	
VV00-1	2000	23,6	46,4	30,6	226,2	430,5	8,4	31,5	nd	nd	nd	35,6	1002,8	
VV00-2	2000	19,4	32,6	31,9	252,7	402,4	7,3	26,2	nd	nd	nd	30,7	972,8	
VV00-3	2000	22,0	39,6	31,2	239,4	416,5	7,8	28,8	nd	nd	nd	33,6	985,8	

Tabela 13. AB Matriz. Ácidos Gordos (áreas relativas expressas em função do padrão interno).

Casta	Amostra	Ano	eta	prop	dimm	but	mbut	hbprop	hexa	etilhexa	octa	nona	deca	benz	dodeca	
Boal	VB98-1	1998	17,0	0,07	1,5	1,1	1,3	2,8	1,3	0,09	0,07	nd	3,0	3,9	0,6	
	VB98-2	1998	14,4	0,08	2,6	1,6	1,0	2,1	1,7	0,09	0,05	0,05	2,2	2,9	0,5	
	VB98-3	1998	10,7	0,06	1,0	0,8	1,3	2,5	2,0	0,07	0,03	0,03	2,6	3,4	0,6	
	VB99-1	1999	13,3	0,1	2,5	1,5	0,9	2,0	1,2	0,06	nd	nd	2,1	2,7	0,4	
	VB99-2	1999	14,8	0,07	2,0	0,6	0,8	1,6	1,1	0,09	0,2	0,2	1,7	2,2	0,5	
	VB99-3	1999	19,7	0,06	1,2	1,4	0,8	1,7	1,7	0,08	0,09	0,1	1,9	2,5	0,4	
	VB00-1	2000	13,4	0,05	2,0	1,6	0,8	1,8	1,8	0,09	0,08	nd	1,9	3,1	0,6	
	VB00-2	2000	16,6	0,08	1,3	0,8	1,0	1,1	1,0	0,11	0,06	nd	2,1	1,5	0,5	
	VB00-3	2000	15,5	0,07	1,2	0,7	0,9	2,9	0,8	0,08	0,08	nd	1,9	2,7	0,8	
	VB98-1	1998	24,6	0,3	1,3	1,3	2,1	5,1	5,1	6,5	0,3	2,9	0,3	4,2	4,3	2,0
Malvazia	VV98-2	1998	31,4	0,2	1,3	2,5	2,2	3,8	7,5	0,4	3,7	0,4	3,8	4,6	1,6	
	VV98-3	1998	26,5	0,3	1,7	1,6	1,5	4,6	9,0	0,3	3,8	0,4	2,5	3,4	1,7	
	VV99-1	1999	21,3	0,4	1,2	1,4	2,0	3,7	7,2	0,3	2,6	0,3	3,7	4,5	1,4	
	VV99-2	1999	22,9	0,4	1,4	1,6	1,3	4,4	4,7	0,2	3,7	0,2	2,4	3,0	1,0	
	VV99-3	1999	27,1	0,3	2,3	2,0	1,6	3,3	5,2	0,2	3,5	0,2	3,0	3,4	1,7	
	VV00-1	2000	24,3	0,4	1,4	1,5	1,6	4,9	6,9	0,3	2,8	0,3	3,8	4,9	2,5	
	VV00-2	2000	29,0	0,4	1,7	1,6	1,8	4,1	7,6	0,2	3,5	0,2	2,0	3,1	1,7	
	VV00-3	2000	27,7	0,3	1,6	1,1	1,6	4,0	6,3	0,5	3,5	0,1	2,2	4,5	1,6	
	VS98-1	1998	20,6	0,1	2,6	1,4	1,3	1,4	1,4	8,4	0,1	24,7	0,6	5,1	0,7	0,7
	VS98-2	1998	23,7	0,2	2,1	1,9	1,3	1,7	1,7	5,6	0,1	19,5	0,4	4,3	0,7	0,5
Sercial	VS98-3	1998	27,1	0,2	2,4	1,3	1,2	1,3	7,7	0,09	22,6	0,5	4,7	0,8	0,6	
	VS99-1	1999	28,8	0,2	1,8	1,0	0,9	1,0	5,5	0,07	17,5	0,4	3,6	0,6	0,5	
	VS99-2	1999	22,3	0,3	1,1	1,2	1,7	1,6	6,8	0,1	19,9	0,5	4,5	0,8	0,5	
	VS99-3	1999	20,5	0,2	1,9	1,1	1,0	1,1	5,8	0,08	18,6	0,4	3,8	0,7	0,5	
	VS00-1	2000	20,9	0,1	2,3	0,7	1,7	1,4	4,3	0,05	22,7	0,5	5,6	0,5	0,6	
	VS00-2	2000	19,2	0,2	1,3	0,8	1,3	1,4	6,0	0,08	19,7	0,4	3,5	0,7	0,6	
	VS00-3	2000	23,0	0,3	2,3	0,7	1,1	1,8	4,2	0,09	16,2	0,4	4,8	0,8	0,4	
	VV98-1	1998	15,1	0,2	1,4	0,6	0,8	0,3	0,3	27,1	0,2	13,2	0,3	2,9	0,8	0,3
	VV98-2	1998	13,1	0,3	1,0	1,1	0,6	0,4	20,7	0,3	16,7	0,3	2,2	0,7	0,4	
	Verdelho	VV98-3	1998	19,1	0,2	0,9	1,4	0,6	0,4	24,4	0,2	15,2	0,4	3,0	0,7	0,3
VV99-1		1999	20,0	0,3	0,7	0,9	1,2	0,2	20,9	0,2	14,2	0,3	2,9	0,6	0,5	
VV99-2		1999	12,4	0,2	1,2	1,3	1,0	0,1	24,6	0,2	21,6	0,2	3,4	0,4	0,4	
VV99-3		1999	17,2	0,3	0,7	0,6	1,0	0,2	27,8	0,1	18,4	0,3	2,1	0,4	0,6	
VV00-1		2000	13,1	0,2	0,7	0,8	0,5	0,1	28,2	0,2	18,5	0,3	2,0	0,7	0,5	
VV00-2		2000	17,2	0,3	0,9	1,0	0,7	0,4	20,8	0,1	24,3	0,3	2,6	0,6	0,5	
VV00-3		2000	15,4	0,3	0,9	0,8	0,5	0,3	19,5	0,1	21,9	0,3	2,7	0,6	0,4	

Tabela 14. AB MatrizÉsteres (áreas relativas expressas em função do padrão interno).

Casta	Amostra	Ano	c6c2	c8c2	c9c2	c10c2	c6h5c2	deacet	benzacet	c12c2	c14c2	c16c2	c18c	lacet	sdc
Boal	VB98-1	1998	6,9	11,5	2,8	42,8	0,6	0,4	1,1	6,7	2,0	7,4	1,8	25,8	12,2
	VB98-2	1998	6,4	18,3	3,9	55,0	0,4	0,4	1,7	8,2	2,9	5,1	1,6	17,3	8,2
	VB98-3	1998	5,1	14,9	3,3	53,9	0,4	0,3	1,4	5,9	2,5	8,3	1,2	29,9	10,2
	VB99-1	1999	5,1	15,8	4,0	52,8	0,5	0,3	1,0	7,9	1,5	8,3	1,3	21,1	11,3
	VB99-2	1999	4,4	13,2	2,8	43,9	0,5	0,3	0,7	8,4	1,9	6,9	1,2	18,0	9,7
	VB99-3	1999	4,7	14,5	2,9	48,4	0,5	0,3	1,7	9,2	1,7	7,6	1,2	19,6	10,5
	VB00-1	2000	5,6	11,1	2,4	37,3	0,3	0,3	1,5	7,1	2,0	5,9	0,9	24,2	9,2
	VB00-2	2000	4,7	14,5	2,9	48,5	0,5	0,3	1,8	9,2	2,4	7,7	1,2	29,3	11,2
	VB00-3	2000	4,1	12,8	1,7	42,9	0,8	0,2	1,7	8,1	1,2	6,8	1,1	26,7	10,2
Malvazia	VV98-1	1998	7,1	62,3	1,4	328,1	0,5	5,5	3,3	23,6	9,0	36,9	5,8	38,7	29,3
	VV98-2	1998	8,1	72,2	1,8	218,1	0,7	6,8	4,1	29,1	11,0	34,7	7,7	27,9	21,2
	VV98-3	1998	5,6	57,3	1,6	273,1	0,6	6,2	3,7	31,4	10,0	40,8	6,8	33,3	25,2
	VV99-1	1999	6,6	53,5	1,0	310,6	0,3	4,0	2,4	23,4	9,5	36,7	6,4	34,3	26,2
	VV99-2	1999	9,6	44,8	0,9	254,4	0,5	3,3	2,0	33,7	8,4	31,9	5,2	25,5	19,5
	VV99-3	1999	10,1	54,1	0,9	282,5	0,3	3,7	2,2	18,6	10,0	34,3	5,8	29,9	22,8
	VV00-1	2000	7,3	55,1	1,5	235,1	0,5	1,8	4,0	23,3	12,9	31,7	7,8	33,9	27,5
	VV00-2	2000	9,1	59,6	0,6	266,3	0,4	2,2	3,4	28,7	13,6	34,4	4,5	28,0	25,2
	VV00-3	2000	8,2	50,3	1,6	150,7	0,4	2,0	4,2	26,0	13,2	33,0	7,1	31,0	26,4
Sercial	VS98-1	1998	25,0	68,9	0,5	83,7	0,4	14,5	0,7	13,2	3,6	25,8	1,8	57,6	6,5
	VS98-2	1998	20,2	71,5	0,6	73,3	0,5	11,8	0,9	10,8	3,1	20,8	1,6	69,1	7,8
	VS98-3	1998	22,6	80,2	0,8	63,5	0,4	13,2	0,8	12,0	3,3	23,3	1,7	63,3	7,1
	VS99-1	1999	18,1	64,2	0,5	75,2	0,3	10,5	0,7	11,6	2,6	18,7	1,3	52,6	6,7
	VS99-2	1999	15,6	55,3	0,5	64,8	0,4	9,1	0,6	8,3	2,3	16,1	1,2	42,7	5,5
	VS99-3	1999	16,9	59,7	0,5	70,0	0,3	9,8	0,7	14,0	2,5	17,4	1,2	47,6	6,1
	VS00-1	2000	16,3	78,0	0,9	67,9	0,6	14,5	0,6	10,6	2,4	16,8	1,2	64,1	5,7
	VS00-2	2000	24,6	61,9	0,5	60,6	0,3	10,6	0,7	8,8	2,2	19,1	1,2	54,4	7,5
	VS00-3	2000	15,5	55,0	0,5	64,3	0,3	9,0	0,6	9,2	2,3	25,9	1,2	61,7	6,6
Verdelho	VV98-1	1998	38,6	245,9	1,8	345,9	0,4	28,7	1,1	23,9	8,2	15,7	1,9	8,4	4,1
	VV98-2	1998	29,4	206,7	1,7	290,7	0,5	32,7	1,1	27,1	7,0	11,7	1,8	7,6	3,8
	VV98-3	1998	34,0	226,3	1,7	318,3	0,4	25,7	1,1	20,5	7,6	13,7	1,8	8,0	4,0
	VV99-1	1999	32,4	178,5	1,3	253,6	0,3	28,1	0,8	31,9	5,9	18,6	1,4	7,5	3,5
	VV99-2	1999	29,7	225,0	0,9	177,6	0,2	19,7	0,6	22,3	4,2	13,1	1,0	6,9	3,3
	VV99-3	1999	36,0	151,7	1,1	215,6	0,2	23,9	0,7	27,1	5,1	15,8	1,2	7,2	3,4
	VV00-1	2000	31,7	234,1	1,1	291,7	0,4	21,5	1,1	24,4	7,6	14,3	1,1	6,3	2,2
	VV00-2	2000	30,0	226,8	1,0	281,3	0,3	30,3	1,6	23,1	6,3	13,5	1,0	7,9	2,9

Tabela 15. AB Matriz Compostos Carbonilados (áreas relativas expressas em função do padrão interno).

Casta	Amostra	Ano	nona	benzal	fur	emf	hmf	butiro	pentol
Boal	VB98-1	1998	nd	32,7	0,6	nd	0,6	0,5	nd
	VB98-2	1998	nd	30,0	0,8	nd	0,7	0,6	nd
	VB98-3	1998	nd	31,4	0,7	nd	0,6	0,5	nd
	VB99-1	1999	nd	24,7	0,6	nd	0,4	0,3	nd
	VB99-2	1999	nd	29,7	0,5	nd	0,8	0,5	nd
	VB99-3	1999	nd	27,2	0,5	nd	0,5	0,3	nd
	VB00-1	2000	nd	31,0	0,7	nd	0,7	0,4	nd
	VB00-2	2000	nd	34,5	0,7	nd	0,6	0,5	nd
	VB00-3	2000	nd	32,8	0,5	nd	0,7	0,5	nd
	Malvazia	VV98-1	1998	nd	13,4	0,3	nd	1,3	nd
VV98-2		1998	nd	15,8	0,5	nd	1,7	nd	0,3
VV98-3		1998	nd	14,6	0,4	nd	1,5	nd	0,2
VV99-1		1999	nd	14,2	0,2	nd	0,9	nd	0,1
VV99-2		1999	nd	13,3	0,4	nd	1,1	nd	0,2
VV99-3		1999	nd	11,7	0,3	nd	1,0	nd	0,2
VV00-1		2000	nd	12,7	0,4	nd	2,7	nd	0,2
VV00-2		2000	nd	10,2	0,2	nd	1,8	nd	0,2
VV00-3		2000	nd	15,4	0,5	nd	0,8	nd	0,2
Sercial		VS98-1	1998	nd	6,0	0,1	nd	0,6	nd
	VS98-2	1998	nd	8,6	0,2	nd	0,7	nd	0,09
	VS98-3	1998	nd	7,3	0,1	nd	0,6	nd	0,08
	VS99-1	1999	nd	4,6	0,1	nd	0,4	nd	0,08
	VS99-2	1999	nd	6,7	0,2	nd	0,5	nd	0,06
	VS99-3	1999	nd	5,1	0,2	nd	0,5	nd	0,06
	VS00-1	2000	nd	8,1	0,2	nd	0,6	nd	0,06
	VS00-2	2000	nd	5,5	0,2	nd	0,4	nd	0,09
	VS00-3	2000	nd	7,8	0,2	nd	0,6	nd	0,07
	Verdelho	VV98-1	1998	1,2	2,7	0,5	0,4	4,7	0,3
VV98-2		1998	1,7	3,7	0,4	0,3	4,0	0,2	0,08
VV98-3		1998	1,4	3,2	0,5	0,3	4,3	0,2	0,09
VV99-1		1999	0,9	2,0	0,3	0,3	3,1	0,2	0,07
VV99-2		1999	1,2	2,6	0,4	0,3	3,9	0,2	0,09
VV99-3		1999	1,0	3,3	0,3	0,3	3,5	0,2	0,08
VV00-1		2000	0,7	3,6	0,4	0,4	4,3	0,2	0,08
VV00-2		2000	1,0	2,1	0,5	0,3	3,9	0,3	0,06
VV00-3		2000	0,9	2,9	0,4	0,3	2,6	0,1	0,09



FIM ...

O estudo da caracterização aromática reveste-se de inegável interesse ao nível enológico, na medida em que está relacionada com aspectos produtivos, económicos e de qualidade. Sendo a produção de vinhos uma actividade de reconhecida tradição e importância na economia regional e nacional, os estudos que se efectuem têm a vantagem de poder contribuir para o conhecimento e defesa das nossas denominações de origem, e para o aumento da qualidade dos nossos produtos e, conseqüentemente, podem contribuir para um melhor posicionamento dos produtores face a mercados cada vez mais globais, mas também onde impera uma concorrência e um grau de exigências muito elevado.