

JOANA MARCOS DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM VINHOS PRODUZIDOS A PARTIR DE CASTAS
AUTÓCTONES DA REGIÃO DO ALGARVE POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) E
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)**



2022

JOANA MARCOS DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM VINHOS PRODUZIDOS A PARTIR DE CASTAS
AUTÓCTONES DA REGIÃO DO ALGARVE POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) E
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)**

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Ludovina Rodrigues
Galego e Professor Doutor José Paulo da Silva



2022

Determinação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos em Vinhos produzidos a partir de castas autóctones da região do Algarve por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Joana Marcos dos Santos)

“Copyright” Joana Marcos dos Santos

“A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos”.

“O Algarve sempre exerceu um especial fascínio sobre os portugueses e, por isso, não descansámos enquanto o mapa de Portugal não tocou a costa orientada a Sul. E qual não terá sido o espanto de alguns, quando testemunharam incrédulos, certamente, que afinal o sol nem sempre dorme no mar.”

Francisco Toscano Rico, Presidente do Instituto da Vinha e do Vinho (IVV).

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, auxiliando me nas dificuldades que surgiram ao longo deste tempo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Ludovina Galego pelo apoio, pela disponibilidade contínua, por todas as críticas construtivas, pela orientação e pela paciência sem medida durante todo este percurso.

Ao Professor Doutor José Paulo da Silva pelo auxílio, disponibilidade e entusiasmo com que me ajudou.

À Eng^a Vera Francisco e à Eng^a Vera Gonçalves, Técnica do Laboratório de Enologia e Técnica do Laboratório de Química, pela ajuda nas análises laboratoriais e à Eng^a Clarisse Ramalho, Técnica do Laboratório de Processamento e Desenvolvimento de Novos Produtos pelo apoio incansável.

Ao Eng^o Mário Santos, da Quinta da Tôr, pela disponibilidade e pelas amostras de uvas fornecidas para elaboração do presente trabalho.

Aos meus colegas e amigos Vera Soares e Marco Calixto pela amizade, companheirismo, incentivo e entusiasmo ao longo de todo o mestrado.

Por fim, e não menos importante, agradecer à minha família e restantes amigos pelo apoio incondicional, amor, paciência e incentivo para ultrapassar todos os obstáculos.

A todos o meu grande Obrigado.

Resumo

A região vitivinícola do Algarve situa-se no extremo sul de Portugal e é caracterizada pelas condições edafo-climáticas da região. Um dos fatores mais importantes para a identidade dos vinhos algarvios é a diversidade do património vitícola que reside nas castas autóctones, Negra Mole e Crato Branco. A Negra Mole encontra-se na base dos famosos vinhos palhete e clarete dando origem a vinhos leves e frutados. A Crato Branco (ou Síria) é uma casta branca que produz vinhos frutados com aroma cítrico. A qualidade do vinho está diretamente relacionada com a composição química das uvas. A presença de determinados ácidos orgânicos nas uvas, afetam as características organolépticas do vinho. O objetivo desta dissertação foi estudar os ácidos orgânicos e compostos fenólicos presentes nestas castas e em vinhos produzidos a partir destas. Foram realizadas análises físicas-químicas às uvas e otimizados métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modo isocrático para quantificação de ácido cítrico, succínico, chiquímico, cafeico, gálico, vanílico, catequina, resveratrol e antocianinas a diferentes comprimentos de onda. Também foram identificados diferentes compostos fenólicos presentes nas uvas e vinhos por LC-MS. As uvas Negra Mole apresentaram maior teor de ácido tartárico ($387,9 \pm 0,6$ mg/kg matéria seca) e as uvas Crato Branco a maior concentração de ácido málico ($141,2 \pm 0,2$ mg/kg matéria seca). A maior quantidade de resveratrol ($3,54 \pm 0,01$ µg/g matéria seca) e antocianinas foram detetadas nas uvas Negra Mole, nomeadamente, nas películas ($0,07 \pm 0,01$ mg/g matéria seca). Nos vinhos estudados foi determinado que a maior quantidade de ácido tartárico se encontra nos vinhos produzidos com Negra Mole ($6,13 \pm 0,03$ g/l). As maiores concentrações de antocianinas foram detetadas nos vinhos tintos ($420,56 \pm 0,01$ mg/l) e a maior quantidade de resveratrol foi detetada nos vinhos brancos ($9,94 \pm 0,01$ mg/l).

Palavras-chave: ácidos orgânicos, compostos fenólicos, HPLC, castas autóctones, vinhos Algarvios

Abstract

The Algarve wine region is located in the extreme south of Portugal and is characterised by the particular conditions of the region. One of the most important factors in the identity of Algarve wines is the diversity of their viticultural heritage, which is rooted in the autochthonous grape varieties, Negra Mole and Crato Branco. Negra Mole is the basis for the famous Palhete and Clarete wines. Crato Branco (or Síria) is a white grape variety that produces fruity wines with citrus aroma. The quality of the wine is directly related to the chemical composition of the grapes that's why certain organic acids in grapes affects the characteristics of the wine. The objective of this dissertation was to study the organic acids and phenolic compounds present in these grapes and in the wines produced from them. Physical and chemical analyses were performed on the grapes and part of a high-performance liquid chromatography (HPLC) was optimised for the quantification of citric acid, succinic acid, shikimic acid, catechin, caffeic acid, gallic acid and vanillic acid at different wavelengths. The phenolic compounds in grapes and wines were also identified by LC-MS. Negra Mole grapes had the highest tartaric acid content ($387,9 \pm 0,6$ mg/kg dry weight) and Crato Branco grapes had the highest malic acid content ($141,2 \pm 0,2$ mg/kg dry weight). The highest amounts of resveratrol ($3,54 \pm 0,01$ μ g/g dry weight) and anthocyanins were detected in Negra Mole, specifically in the grape skins ($0,07 \pm 0,01$ mg/g dry weight). Among the wines studied, the highest tartaric acid content was found in wines from Negra Mole grapes ($6,13 \pm 0,03$ g/l). The highest concentration of anthocyanins was found in red wines ($420,56 \pm 0,01$ mg/l) and the highest amount of resveratrol was detected in white Wines ($9,94 \pm 0,01$ mg/l).

Keywords: organic acids, phenolic compounds, HPLC, native grape varieties, Algarve wines

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de abreviatura, siglas e símbolos.....	ix
1. Introdução	1
1.1 Vinho no Algarve	1
1.2 A qualidade dos vinhos.....	1
1.3 Características Edafoclimáticas da região	2
1.4 Os vinhos algarvios	3
1.5 Castas autóctones da região do Algarve.....	4
1.5.1 Negra Mole	4
1.5.2. Crato Branco /Síria	5
1.6 Constituição Ácida dos mostos e dos Vinhos.....	5
1.6.1 Principais ácidos orgânicos fixos.....	6
1.7 Acidez nos vinhos.....	11
1.8 Compostos fenólicos nas uvas e no vinho	12
1.9 Atividade antioxidante em Vinhos	16
1.10 Métodos analíticos para determinação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos	16
1.11 Objetivos práticos do estudo.....	19
2. Material e Métodos	20
2.1 Amostragem.....	20
2.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	20
2.2.1 Determinação dos sólidos solúveis	20
2.2.2 Determinação do pH e densidade	20
2.2.3 Determinação da humidade.....	21
2.2.4 Caracterização física das uvas	21
2.3 Preparação dos extratos alcoólicos das uvas	21
2.4 Preparação das amostras para injeção no HPLC	21
2.5 Reagentes e Solventes utilizados	21
2.6 Preparação das soluções	22
2.6.1 Soluções Padrão de Calibração	22
2.6.2 Fase móvel	24

2.7 Equipamento e condições cromatográficas para análise por HPLC.....	26
2.8 Determinação do comprimento de onda ótimo para cada composto.....	26
2.9 Análise dos compostos	30
2.10 Identificação dos compostos fenólicos pelo sistema LC-MS.....	31
2.11 Determinação da atividade antioxidante dos vinhos do Algarve	31
2.11.1 Método ABTS ^{•+}	31
2.11.2 Teor de fenóis totais (FT)	32
2.12 Análise Estatística.....	32
3. Resultados e Discussão	33
3.1 Características físico-químicas das uvas de castas autóctones na região do Algarve. ...	33
3.2. Curva de Calibração	33
3.3 Determinação dos diferentes compostos nas uvas e vinhos	35
3.4 Quantificação de ácidos orgânicos nas uvas e vinhos algarvios	36
3.5 Quantificação de compostos fenólicos nas uvas e vinhos algarvios	40
3.6 Quantificação de antocianinas em uvas, películas e vinhos do Algarve	42
3.7 Quantificação do resveratrol.....	43
3.8 Diferenças entre compostos das duas castas algarvias por LC-MS.....	45
3.9 Identificação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos vinhos por LC-MS	47
3.10 Caracterização do perfil de antocianinas da Casta Negra Mole por LC-MS.....	49
3.11 Determinação da Atividade antioxidante dos vinhos algarvios.....	51
4. Conclusão.....	52
5. Referências bibliográficas.....	53
6. Anexos	60

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Área Geográfica correspondente às quatro Denominações de Origem Controlada no Algarve (Fonte: («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região»), 2019).	3
Figura 1.2 - Estrutura química dos Principais ácidos orgânicos presentes nas uvas (adaptado de (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006)).	6
Figura 1.3 - Estrutura química dos principais ácidos orgânicos resultantes dos processos fermentativos (adaptado de (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006)).	7
Figura 1.4 - Estrutura química do ácido Chiquímico (adaptado de (Pullinger & Monteiro, 1988)).	11
Figura 1.5 - Estrutura química dos compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos Flavonóides (adaptado de (Merkytė <i>et al.</i> , 2020)).	13
Figura 1.6 - Estrutura química das antocianinas (adaptado de (Merkytė <i>et al.</i> , 2020)).	14
Figura 1.7 - Estrutura química da catequina (adaptado de ((Archela & Dall’Antonia, 2014)).	14
Figura 1.8 - Estrutura química dos compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos não-flavonóides, nomeadamente, os ácidos fenólicos (adaptado de (Merkytė <i>et al.</i> , 2020)).	15
Figura 1.9 - Estrutura química do resveratrol (adaptado de ((Merkytė <i>et al.</i> , 2020)).	16
Figura 1.10 - Esquema geral do equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (adaptado de ((Czaplicki, 2013)).	17
Figura 1.11 - Esquema geral das principais partes do espectrómetro de massas (adaptado de ((Lancas, 2013)).	18
Figura 2.1 - Cromatograma obtido para um macerado de uvas tintas; (A) Cromatograma de um macerado de uvas tintas eluído com acetonitrilo a 15%; (B) Cromatograma de um macerado de uvas tintas eluído com acetonitrilo a 25%.	25
Figura 2.2 - Equipamento de Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC) utilizado no trabalho.	26
Figura 2.3 - Cromatograma de um vinho e de um extrato alcoólico de uva obtidos por HPLC num espectro de absorção de 212 nm; (A) Cromatograma de um vinho tinto (MQNM); (B) Cromatograma de um extrato alcoólico de uva Crato Branco.	27
Figura 2.4 - Cromatograma de um extrato alcoólico da casta Negra Mole obtido pela análise de HPLC num espectro de absorção de 520 nm; (A) Cromatograma de um extrato alcoólico de película de uva Negra Mole; (B) Cromatograma de um extrato alcoólico de uvas inteiras de Negra Mole.	28

Figura 2.5 - Cromatograma de três padrões obtidos por HPLC num espectro de absorção de 280 nm; (A) Cromatograma do padrão de catequina com pico cromatográfico aos 3,52 min; (B) Cromatograma do padrão ácido cafeico com pico cromatográfico aos 4,10 min; (C) Cromatograma do padrão de ácido vanílico com pico cromatográfico aos 4,30 min. 29

Figura 2.6 - Cromatogramas obtidos da análise de HPLC; (A) Cromatograma obtido de uma solução padrão contendo o ácido cítrico com detecção a 212 nm; (B) Cromatograma obtido da injeção de um vinho branco (MQCB) com detecção a 212 nm. Volume da amostra injetado 20 µl; fluxo 1 ml/min; eluente B. 30

Figura 3.1 - Ácidos orgânicos presentes nas uvas e nos vinhos produzidos a partir da casta Negra Mole (HPLC). 1-ácido tartárico, 2- ácido málico, 3-ácido láctico, 4-ácido cítrico, 5-ácido succínico. 35

Figura 3.2- Antocianinas presentes na película das uvas Negra Mole e nos vinhos produzidos a partir desta (HPLC). 1- Malvidina-3-O-glicósido. 36

Figura 3.3 – Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 0-300) e respectivos fragmentos para identificação da catequina obtido por LC-MS (modo negativo). 48

Figura 3.4– Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 50-150) e respectivos fragmentos para identificação do ácido salicílico obtidos por LC-MS (modo negativo). 48

Figura 3.5 - Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 0-300) e respectivos fragmentos para identificação da Quercetina obtido por LC-MS (modo negativo). 48

Figura 3.6- Espectro de massa obtido para as antocianinas por LC-MS: (A)- Malvidina-3-O-glicósido identificada num vinho tinto; (B)- Malvidina-3-O-acetilglicósido e (C)- Malvidina-3-O-coumaroilglicósido identificada nas películas das uvas. 50

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados e respetivas especificações do fabricante.	22
Tabela 2.2 - Gama de concentração de cada analito utilizado para construir as curvas de calibração de cada padrão.	24
Tabela 3.1 - Características físico-químicas das uvas de castas autóctones da região do Algarve.	33
Tabela 3.2 - Curva de calibração obtidas para cada analito.	34
Tabela 3.3 - Teores de ácidos orgânicos encontrados nas uvas das castas autóctones e na casta Syrah (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	37
Tabela 3.4 - Teor de ácidos orgânicos presentes nas uvas das castas tintas Negra Mole e Syrah (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	38
Tabela 3.5 - Teores de ácidos orgânicos presentes em vinhos da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	39
Tabela 3.6 - Teor de compostos fenólicos nas uvas das castas autóctones da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	40
Tabela 3.7 - Teor de compostos fenólicos presentes nos vinhos da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	41
Tabela 3.8 - Teor de antocianinas presente nas películas e no macerado de uvas inteiras da casta Negra Mole produzidas no Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	42
Tabela 3.9 - Teor de antocianinas presente em diferentes vinhos do Algarve monocasta tinta Negra Mole (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	43
Tabela 3.10 - Teor de resveratrol encontrado em diferentes partes das uvas da casta autóctone Negra Mole e em vinhos algarvios (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	44
Tabela 3.11 - Compostos identificados na casta Negra Mole pelo LC-MS	45
Tabela 3.12 - Compostos identificados na casta Crato Branco por LC-MS	46
Tabela 3.13 - Caracterização dos compostos fenólicos encontrados nos vinhos por LC-MS em modo negativo, nomeadamente, tempo de retenção (R_t), peso molecular (MW) e padrão de fragmentação (m/z).	47
Tabela 3.14 - Ião típico e padrão de fragmentação das diferentes antocianinas identificadas nas películas das uvas Negra Mole e nos vinhos produzidos com esta casta.	49
Tabela 3.15 - Propriedades antioxidantes dos vinhos algarvios analisados e as respetivas castas autóctones (média \pm desvio padrão) ($n=3$).	51

Lista de abreviatura, siglas e símbolos

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol) 6-ácido sulfónico

ANOVA - Análise de variância

CVA - Comissão Vitivinícola do Algarve

CVRAL - Comissão Vitivinícola Regional do Algarve

DO - Denominação de Origem

DOC - Denominação de Origem Controlada

FT - Fenóis Totais

HBV - Herdade Barranco do Vale

HPLC-Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (High-performance liquid chromatography)

IG - Indicação Geográfica

IVV - Instituto da Vinha e do Vinho

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

m/z – Razão massa carga

M^+ - Ião molecular carregado positivamente (radical-catião)

MQCB - Morgado do Quintão Crato Branco

MQNM - Morgado do Quintão Negra Mole

MS – Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry)

MW - Peso Molecular (Molecular Weight)

n.d. – Não detectado

OIV – International Organization of Vine and Wine

PAC - Política Agrícola Comum

QP - Quinta da Penina

UV/Vis – Ultravioleta/visível

1. Introdução

1.1 Vinho no Algarve

O consumo de vinho no Algarve, tudo indica, pelos vasos gregos encontrados, que se tenha generalizado no século V a.C., certamente para as classes altas da época (Arruda, 1999). A produção do vinho no Algarve aponta para o período de ocupação romana, encontrando-se nas ruínas de Milreu (Estoi) vestígios dessa produção (Bernardes & Oliveira, 2006). Tudo indica que essa produção se foi mantendo, essencialmente para consumo da população local (Godinho, 2006). No período dos descobrimentos o vinho algarvio era levado pelas naus, que saíam do Algarve, mas é, posteriormente quando os vinhedos do país foram atacados pela filoxera, sobrevivendo apenas os que estavam em terrenos arenosos, como na época, a maioria dos vinhedos algarvios, que se dá uma grande procura pelos vinhos produzidos no Algarve. Mas logo que o país recuperou dessa praga, a produção no Algarve volta a cair e a centrar-se em pequenas produções familiares (Rosário, 2018). O desenvolvimento turístico da região a partir de meados do século XX levou a um grande declínio da vinha no Algarve, mas a entrada no século XXI fez renascer de novo o espírito de produção de vinhos, os vinhos de quinta, e o aumento de produção e qualidade tornaram-se uma constante (Rosário, 2018).

1.2 A qualidade dos vinhos

A procura de qualidade dos vinhos já se fazia notar na região do Algarve. No século XVIII, a Câmara Municipal de Faro já obrigava os taberneiros, que vendiam o vinho a retalho, mantivessem os recipientes cobertos, com madeira ou panos de linho e que usassem funis com ralo e medidas aferidas na transação dos mesmos (Godinho, 2006).

Com as doenças (oídio, míldio e principalmente a filoxera), que começaram a provocar grandes prejuízos nas vinhas, foi preciso repensar o controlo de qualidade. Surge algum associativismo, que posteriormente levou à criação de adegas cooperativas, no início do século XX. Nessas adegas já existem técnicos capacitados para ajudar os produtores no processo de cultivo da vinha e de produção do vinho. Só em meados do século XX surgem no Algarve essas Adegas cooperativas: Lagoa, Lagos, Portimão e Tavira. A qualidade dos vinhos melhora, mas começa a fazer-se sentir a necessidade de os diferenciar e de regular a produção a nível nacional e comunitário. O Decreto-Lei 288/90 de 24 de setembro cria a região demarcada do Algarve que engloba quatro sub-regiões com a designação das adegas existentes (Lagoa, Lagos, Portimão e Tavira). Contudo com muitas vinhas a serem arrancadas só subsistiram as adegas de Lagoa e Lagos que posteriormente formaram a adega Única, mas as sub-regiões mantiveram-se, tendo a Comissão Vitivinícola do Algarve (CVA) estabelecido a organização para a certificação dos

vinhos do Algarve, quer como vinhos de denominação de origem controlada (DOC) quer como vinhos com indicação geográfica protegida (IGP) (Rosário, 2018).

1.3 Características Edafoclimáticas da região

O Algarve é a região localizada no extremo sul de Portugal Continental, entre 37° e 38° de latitude e ocupa uma área de 4.997 km², o que corresponde a 5,4% da área total de Portugal (Gaspar & Pinto, 2012).

A localização meridional do Algarve e a sua exposição ao sul, fazem com que o clima seja acentuadamente mediterrânico. Trata-se de uma região de clima marítimo ameno caracterizado pela influência do Oceano Atlântico e em simultâneo de uma região de clima quente, seco, pouco ventoso com reduzidas amplitudes térmicas pela existência das barreiras montanhosas a norte (Serra de Monchique e do Caldeirão). A região beneficia de uma média de insolação acima das 3000 horas de sol ao ano tornando o clima perfeito para a produção vinícola (IVV, sem data). O Algarve conta com solos bastante diversificados. No Sotavento e no Litoral da região verificam-se solos franco-arenosos e argiloarenosos, enquanto que no interior os solos argilo-calcários ou xistosos (Loureiro, 2016).

As diferenças climáticas existentes dão origem a diferentes *terroirs*¹, cuja expressão é bastante visível nos vinhos provenientes da região do Algarve. São estas características e a tipicidade que as condições edafoclimáticas conferem ao vinho que os tornam únicos e permite distinguir as regiões de Denominação de Origem Controlada. Segundo o Decreto-Lei nº299/90, de 24 de setembro, Decreto-Lei nº318/2003, de 20 de dezembro e o Regulamento (CE) 1493/99, de 17 de maio. No Algarve existem quatro regiões que produzem vinho com Denominações de Origem Controlada (DOC), nomeadamente Lagos, Lagoa, Portimão e Tavira (figura 1.1).

¹ Termo francês que traduz a interação entre clima, solo, geologia e viticultura influenciando as características das uvas de uma determinada casta e consequentemente a qualidade do vinho.

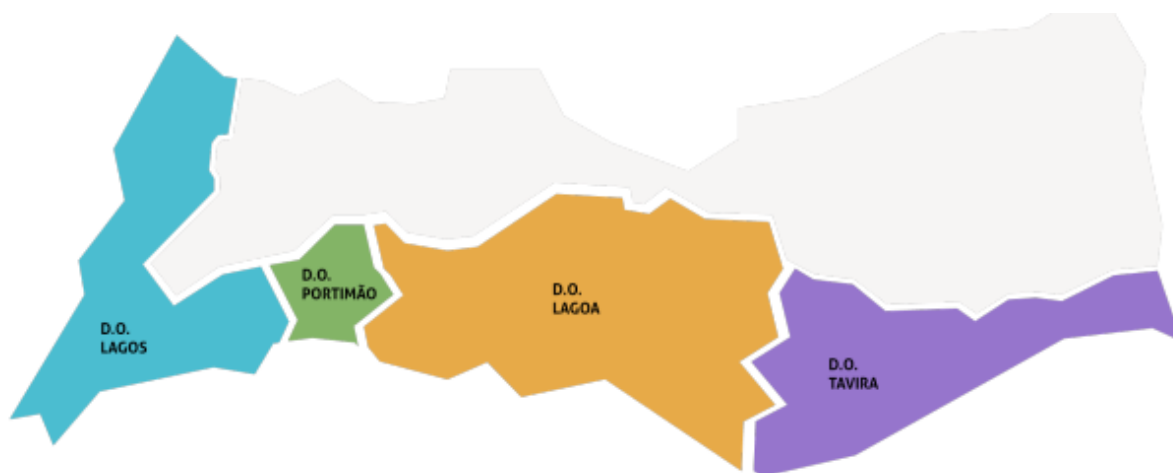


Figura 1.1 - Área Geográfica correspondente às quatro Denominações de Origem Controlada no Algarve (Fonte: («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região»), 2019).

No entanto, grande parte dos produtores optam pela certificação Indicação Geográfica Algarve (IG Algarve), sendo classificados como Vinho Regional Algarve. Esta certificação permite que os produtores mantenham as características inigualáveis do produto sem que seja obrigado a atender a práticas enológicas, castas e tempos de estágio definidos para um determinado Denominação de Origem (DO).

1.4 Os vinhos algarvios

O Algarve é uma região com fortes tradições vitivinícolas e, nos últimos anos assistimos ao renascer da tradição dos vinhos de Quinta. Em geral, cada Quinta utiliza as suas próprias técnicas de produção registando um aumento significativo na produção vinícola. Assiste-se ao regresso às origens, isto é, quando cada produtor fazia o seu próprio vinho, em casa com as castas autóctones, procurando obter vinhos com o que é mais característico do Algarve, as castas Negra Mole e Crato Branco. As castas que crescem em solo algarvio conferem cores e aromas ricos, tanto nos vinhos brancos, nos tintos ou rosés. É o *terroir* típico do Algarve que torna estes vinhos tão especiais (Bernardes & Fontes, 2006).

Tem-se observado uma tendência cada vez maior para vinhos brancos frutados. Geralmente são vinhos jovens e frescos sendo que a cor varia entre o citrino e o palha. Trata-se de vinhos com aroma frutado, floral, cítricos, acidez natural e um grau alcoólico que não ultrapassa os 13% sendo que se destacam os vinhos brancos de inverno (Rosário, 2018). A sua complexidade advém das macerações prolongadas e do estágio em barrica. São vinhos caracterizados pela sua cor amarelo-clara, aroma a frutos tropicais e ervas aromáticas, com um teor alcoólico que varia entre os 13-14%. Nos vinhos rosés do Algarve, distinguem-se dois

perfis, os rosés frutados e os rosés gastronómicos (vinhos para mesa) (Rosário, 2018). Os rosés frutados apresentam uma tonalidade rosa-claro e aroma frutado. São vinhos frescos, obtidos a partir de uma ou mais castas, e o teor alcoólico não deve ultrapassar os 12,5%. Os rosés gastronómicos diferem dos frutados pela tonalidade mais escura, pelo aroma a frutos do bosque e ervas aromáticas («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região», sem data). Normalmente, resultam do *blend*² das principais castas tintas do produtor apresentando-se como vinhos mais estruturados com taninos mais perceptíveis. Na categoria dos vinhos tintos algarvios observam-se diferentes perfis. Os vinhos tintos frutados para consumo imediato produzidos a partir de uma ou mais castas sem estágio em barrica caracterizados pelo aroma a frutos vermelhos e taninos presentes. Dentro deste perfil observam-se os vinhos de cor aberta obtidos da casta Negra Mole. Os vinhos tintos gastronómicos relativamente encorpados resultado do *blend* de castas tintas e estágio em barricas de carvalho e os vinhos tintos de guarda geralmente de elevada qualidade obtidos de monocastas onde o estágio em madeira serve de complemento ao frutado das castas (Miranda, 2021). Para além de todos os vinhos acima mencionados importante será referir os vinhos licorosos. O Algarve tem uma longa tradição na produção deste tipo de vinhos. Destes destaca-se o vinho licoroso branco seco feito a partir da casta Crato Branco onde a fermentação ocorre em bica aberta em barricas de madeira. Este caracteriza-se por ser muito seco, pelo seu aroma a frutos secos e pelo teor alcoólico que pode chegar aos 16% («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região», 2020).

1.5 Castas autóctones da região do Algarve

1.5.1 Negra Mole

A Negra Mole tem o seu berço no Algarve e é uma casta exclusiva da região. É extremamente importante no encepamento da região do Algarve, onde é a principal casta cultivada, ocupando uma área de 235 ha. Nos anos 80 do século passado ocupava 75% da área de vinha no Algarve (Rosário, 2018). Esta é uma casta de média produtividade e maturação média, preferindo climas quentes e secos. Do ponto de vista morfológico, apresenta cachos médios, cónicos, pouco compactos e os bagos são grandes de coloração rosada a vermelho-escuro. A película apresenta uma espessura média e a polpa mole. Dá origem a vinhos de coloração rosada com um agradável perfil aromático, taninos suaves e aptidão para consumir cedo (Manuela *et al.*, 2019).

² Também denominado por *assemblage* (em francês), é o termo utilizado para designar um vinho produzido a partir da mistura de diferentes castas de uvas. Normalmente a mistura de castas tem o intuito de melhorar a qualidade, sabor e aromas do vinho.

A presente casta encontra-se dispersa por toda a região algarvia, sendo uma das principais e únicas castas a integrar os icónicos vinhos, Palhete e Clarete algarvios. Os palhetes são obtidos pela mistura de uvas brancas e tintas. Nalguns casos a mistura é natural e feita apenas de Negra Mole pela frequência de talhões com uvas brancas, rosadas e tintas. Desta mistura natural resulta um vinho tinto de cor aberta, aromático e frutado (Maçanita, 2017).

Na ilha da Madeira existe a casta Tinta Negra cuja história e características têm muitas semelhanças com a casta Negra Mole e por isso origina alguma confusão com a Negra Mole do Algarve (Ughetto, 2012).

1.5.2. Crato Branco /Síria

A casta Crato Branco (ou Síria), como é vulgarmente conhecida na região do Algarve, é uma casta bastante favorecida pelas Adeias Cooperativas na região tendo-se dispersado em prejuízo de outras («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região», 2020). Trata-se de uma casta de maturação tardia que prefere climas quentes moderados, sensível às chuvas tardias. É a terceira casta mais produzida na região ocupando 95 ha de cultivo (IVV, sem data). Os cachos apresentam-se médios com bagos verde-amarelados de película medianamente espessa e polpa rija e sumarenta. Os vinhos obtidos a partir de Crato Branco apresentam tons cítricos, aroma intenso, fino e equilibrado. São vinhos ligeiramente ácidos com características frutadas, sobretudo enquanto jovens («Vinhos do Algarve - O Renascer de uma Região», 2020).

1.6 Constituição Ácida dos mostos e dos Vinhos

Uma das mais relevantes e determinantes características químicas dos mostos e dos vinhos encontra-se relacionada com a sua constituição ácida (Picariello *et al.*, 2019). A sua natureza e concentração tem um contributo significativo na composição, estabilidade e características organoléticas do vinho (Izquierdo-Llopart & Saurina, 2019). A constituição ácida determina alguns fatores condicionantes no equilíbrio físico-químico e microbiológico assegurando proteção dos mostos e vinhos contra a ocorrência de desordens no seu processo evolutivo e inibindo o crescimento microbiológico (Picariello *et al.*, 2019). Deste modo, a análise e monitorização das concentrações de ácidos orgânicos presentes no vinho são de elevado interesse na produção vinícola.

A origem dos diferentes ácidos constituintes dos vinhos é bastante diversificada e podem ter gênese nas uvas, ou seja, o teor de ácidos orgânicos no vinho encontra-se relacionado com a região e clima em que as uvas cresceram e amadureceram. Em vinhos com origem em climas quentes esperam-se maiores teores de ácido tartárico e nos vinhos provenientes de

origens mais frescas espera-se uma predominância de ácido málico (Zeravik *et al.*, 2016). Estes, também, podem ter origem na atividade de diferentes microrganismos (leveduras, bactérias acéticas, bactérias lácticas), processos de fermentação alcoólica e maloláctica dos mostos e vinhos, e pela adição de corretivos ácidos.

1.6.1 Principais ácidos orgânicos fixos

São os ácidos orgânicos fixos, ou seja, não voláteis, que conferem ao vinho as suas características organoléticas relacionadas com o “gosto ácido” (Picariello *et al.*, 2019). A acidez nos vinhos é influenciada pelos teores de ácidos orgânicos presentes nas uvas, assim como os ácidos orgânicos resultantes da fermentação alcoólica. Os ácidos orgânicos que derivam das uvas incluem principalmente os ácidos tartárico, málico e cítrico (Figura 1.2). Estes ácidos são responsáveis pela elevada proporção de acidez titulável. Os ácidos orgânicos resultantes do processo fermentativo são, principalmente, o ácido láctico, succínico e acético, que também contribuem para as características organoléticas e sensoriais dos vinhos (Figura 1.3) (Izquierdo-Llopart & Saurina, 2019).

Os ácidos orgânicos não contribuem apenas para a acidez geral ou total, mas apresentam as suas próprias características sensoriais quando presentes em quantidades detetáveis no vinho. A maioria dos ácidos orgânicos contribuem positivamente para o aroma e sabor do vinho quando se encontram acima do seu limiar sensorial. No entanto, elevadas concentrações destes ácidos individualmente podem conduzir a efeitos sensoriais indesejáveis. Um exemplo pode ser o ácido succínico que pode conferir um sabor amargo ou metálico ao vinho (Mato *et al.*, 2005).

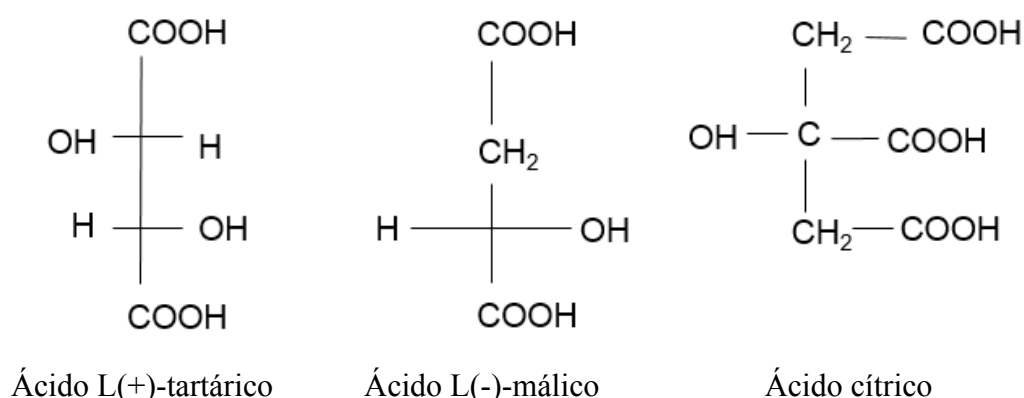


Figura 1.2 - Estrutura química dos Principais ácidos orgânicos presentes nas uvas (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

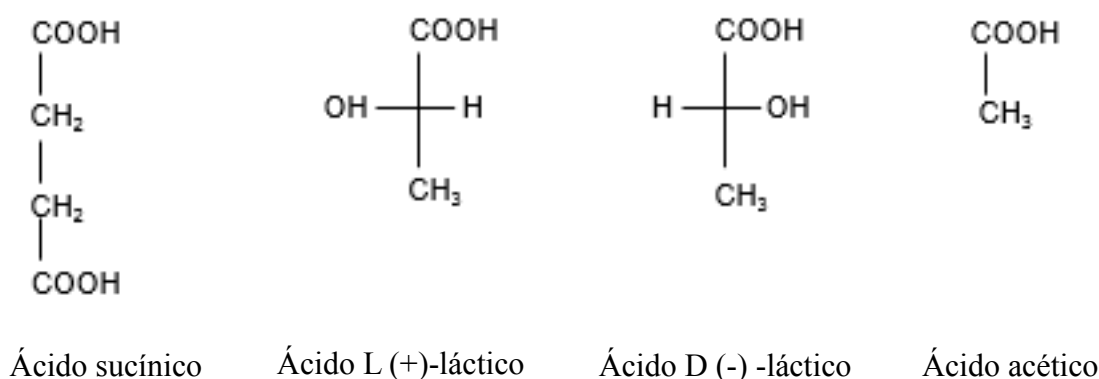


Figura 1.3 - Estrutura química dos principais ácidos orgânicos resultantes dos processos fermentativos (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.6.1.1 Ácido Tartárico

De entre todos os ácidos orgânicos existentes, o ácido tartárico é o mais importante. A sua importância advém dos teores que apresenta e das características químicas e organolépticas. O ácido tartárico é o isómero L (+) “específico” da uva, sendo a videira uma das raras plantas capazes de o sintetizar em quantidades elevadas (Rizzon & Miele, 2001).

Os teores de ácido tartárico são influenciados pelas condições climáticas. Nos períodos de temperaturas altas verifica-se uma diminuição do teor de ácido tartárico pela combustão respiratória, enquanto nos períodos mais chuvosos se verifica a migração deste ácido para o bago da uva. A diminuição deste ácido é contínua após a vinificação, tornando-se mais evidente durante a primeira fase de maturação do vinho. O seu teor continua a decrescer pela insolubilidade, principalmente, dos sais de cálcio (tartarato de cálcio) e potássio (bitartarato de potássio) influenciada pelas baixas temperaturas (Izquierdo-Llopart *et al.*, 2020).

Do ponto de vista químico, o ácido tartárico é o ácido orgânico presente mais forte capaz de interferir diretamente no pH do vinho e resistente à oxidação. É o ácido eleito para a correção do pH dos mostos e vinhos (Rizzon & Sganzerla, 2007). Por outro lado, é um dos ácidos orgânicos das uvas mais resistente à atividade bacteriana (Curvelo-Garcia & Barros, 2015). Este ácido é empregue quando os vinhos e mostos apresentam baixos valores de acidez total com o intuito de aumentar a sua acidez pela diminuição de pH, e consequentemente prevenir a contaminação de bactérias.

Para além de permitir a correção ácida na vinificação e estabilidade microbiológica do vinho, o ácido tartárico permite melhorar as características organolépticas do vinho. Quando

presente em grandes quantidades, confere aspereza ao vinho mas, em concentrações adequadas confere uma certa adstringência e “fineza” ácida ao vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.6.1.2 Ácido Málico

O ácido L (-) -málico é um ácido orgânico presente nas folhas e frutos sendo bastante vulgar no reino vegetal e representando 50% da acidez total das uvas (Jackson, 2008).

A concentração de ácido málico é abundante nas uvas não maduras podendo atingir concentrações até 25 g/L. No entanto, a sua concentração decresce ao longo da maturação atingindo valores de 1-2 g/L (Jackson, 2008). Esta diminuição faz com que o pH interno das uvas aumente de 2,5 para 3,5. Durante a maturação das uvas verifica-se uma diminuição na concentração de ácido málico resultante do decréscimo significativo da biossíntese de ácido L-málico sincronizada com um aumento da degradação de ácido málico via respiração celular (Volschenk *et al.*, 2006).

A diminuição de ácido málico pode atingir os 90% sendo muito importante acompanhar o teor deste ácido para a caracterização do estado de maturação das uvas e conseqüentemente, a qualidade final da vindima (Curvelo-Garcia & Barros, 2015). A diminuição da concentração de ácido málico é mais significativa em períodos quentes pela respiração rápida do malato presente no bago, conduzindo à produção de vinhos suaves. Pelo contrário, vinhos produzidos em regiões de climas mais frios apresentam teores de ácido málico mais elevado e vinhos mais adstringentes (Olego *et al.*, 2016).

As leveduras, durante a fermentação alcoólica, degradam uma pequena parte do ácido málico em ácido pirúvico e seguidamente em etanol. O processo de fermentação maloláctica é considerado o mais adequado para reduzir a acidez do vinho. Nesta fermentação acontece a transformação do ácido málico em ácido láctico L (+), metabolizado por bactérias lácticas com libertação de dióxido de carbono. Aquando desta fermentação verifica-se uma diminuição no sabor ácido do vinho, melhorias na estabilidade microbiológica e aumento na complexidade de aroma e sabor do vinho (Sumbly *et al.*, 2014).

1.6.1.3 Ácido Cítrico

O ácido cítrico é bastante comum no reino vegetal, principalmente em frutos cítricos. Trata-se de um ácido orgânico que se encontra em fracas quantidades nas uvas e praticamente ausente nos vinhos. Tal como acontece com o ácido málico, o ácido cítrico é facilmente degradado por bactérias lácticas (Garrido-Delgado *et al.*, 2009). Elevadas concentrações de

ácido cítrico durante a fermentação podem condicionar a taxa de crescimento das leveduras tornando-a mais lenta (Nielsen & Arneborg, 2007).

A concentração de ácido cítrico aumenta ligeiramente durante a fermentação alcoólica sendo seguidamente consumida durante a fermentação maloláctica. As concentrações de ácido cítrico no mosto e no vinho antes da fermentação maloláctica são baixas, cerca de 0,5 a 1 g/L (Kalathenos *et al.*, 2008). O ácido cítrico é comumente utilizado pelos produtores vinícolas com o objetivo de reequilibrar a acidez natural dos vinhos e os estabilizar contra um possível aparecimento de casse férrica (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

A adição deste ácido tem influência na acidez e sabor do vinho sendo atribuído ao vinho a perceção de frescura (Chidi *et al.*, 2018). O emprego enológico do ácido cítrico deve ser realizado tendo em conta o limite legal, ou seja, segundo o Regulamento (CE) nº606/2009, o teor de ácido cítrico não deverá ultrapassar 1 g/L. A utilização de ácido cítrico em vinhos tintos deve ser realizada de forma prudente devido à sua instabilidade relativamente ao ataque de bactérias lácticas, promovendo a formação de acidez volátil (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

1.6.1.4 Ácido Succínico

O ácido succínico é um subproduto resultante da fermentação alcoólica dos açúcares em quantidades que dependem das condições de fermentação e daí a sua importância como ácido que caracteriza a qualidade do vinho. O ácido succínico pode também ser formado a partir dos ácidos glutâmico e málico. Este ácido confere ao vinho uma acidez intensa e uma mistura de gosto amargo e salino (Alpuim, J.P, 1997; Izquierdo-Llopart *et al.*, 2020).

Muitas das vezes é necessário proceder a ajustes na acidez dos vinhos para níveis que beneficiem a qualidade e estabilidade dos vinhos. Apesar dos vinhos serem produzidos com mostos de uvas com níveis de acidez ótimos, muitas das vezes no final da vinificação verifica-se elevados níveis de acidez titulável. É a produção de ácido succínico, durante a fermentação alcoólica, a principal responsável por este aumento (Song & Lee, 2006). O ácido succínico representa cerca de 90% dos ácidos não voláteis produzidos durante a fermentação alcoólica, sendo o seu teor no vinho de aproximadamente 0,5-1,5 g/L. Contudo tem se verificado concentrações até 3,0 g/L de ácido succínico em determinados vinhos tinto (Chidi *et al.*, 2018).

Assim é muito importante a monitorização deste ácido para perceber quais os fatores que envolvem a produção de ácido succínico e ajustá-lo de forma a conseguir manter a acidez titulável dos vinhos.

1.6.1.5 Ácido Láctico

O ácido láctico é o principal produto da fermentação maloláctica e é um ácido que contribui de forma geral para a acidez no vinho. O seu interesse, por parte dos produtores vinícolas, reside no facto da conversão do ácido málico em ácido láctico melhorar as características organoléticas do vinho. O ácido láctico é muito mais suave ao palato que o ácido málico (Chidi *et al.*, 2018).

Este ácido não se encontra nas uvas, mas é um ácido habitual nos vinhos, uma vez que é formado pelas leveduras durante a fermentação alcoólica sendo a sua concentração relativamente baixa. Aquando da atividade metabólica das bactérias do ácido láctico (fermentação maloláctica), verifica-se um incremento na concentração deste ácido. Os vinhos que não sofreram fermentação maloláctica apresentam um teor em ácido láctico baixo, cerca de 0,2 a 0,4 g/L e contêm sobretudo ácido D(-)-láctico. Por outro lado, os vinhos submetidos a fermentação maloláctica apresentam concentrações de ácido láctico mais elevadas, cerca de 3-4 g/L (Comuzzo & Battistutta, 2019). O ácido predominante é o L(+)-láctico, o único produzido por este processo fermentativo. No entanto, o ácido láctico também pode ser formado mediante a atividade das bactérias sobre os açúcares redutores podendo ser originados qualquer um dos dois isómeros. Neste sentido verifica-se um aumento do isómero D(-) que poderá provocar aumento da acidez volátil e comprometer a qualidade do vinho (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

1.6.1.6 Ácido Acético

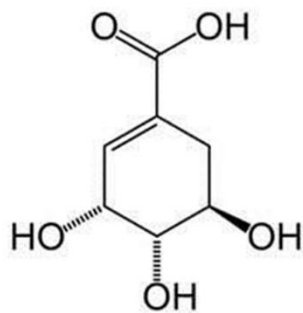
O ácido acético é o principal responsável pela acidez volátil do vinho, representando mais de 90% do conjunto total (Curvelo-Garcia & Barros, 2015). Os restantes ácidos encontram-se em quantidades muito reduzidas, sendo apenas detetados quando existe contaminação microbiológica. Este ácido existe em pequenas quantidades no mosto sendo resultado da atividade metabólica das leveduras durante a fermentação alcoólica. Teores mais elevados de acidez volátil significa que houve intervenção das bactérias lácticas capazes de alterar o vinho ou crescimento de bactérias acéticas resultando em defeitos organoléticos determinados pela formação do acetato de etilo. Para além disso, elevadas concentrações de ácido acético informam que existiu algum “acidente” na fermentação alcoólica ou que existiu contaminação bacteriana (Mira *et al.*, 2021).

O ácido acético é o principal responsável pelo aroma a vinagre no vinho. Este aroma torna-se mais acentuado quando as concentrações se encontram acima dos valores

regulamentados podendo o vinho tornar-se em vinagre. Deste modo, é importante o controlo da evolução do ácido acético desde o processo fermentativo do vinho. Em pequenas quantidades encontra-se associado a aromas frutados (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

1.6.1.7 Ácido Chiquímico

O ácido chiquímico provém, maioritariamente, das películas das uvas sendo que se encontra presente em pequenas quantidades no mosto (10-150 mg/L) e é transferido para o vinho durante o processo de maceração e fermentação (Figura 1.4) (Ivanova-Petropulos *et al.*, 2018). Atua como precursor dos ácidos benzóicos, cinâmicos, flavonóides (flavonóis e antocianinas) e outros compostos presentes nas uvas que possam ser transferidos para o vinho durante o processo de vinificação. Este ácido não tem importância do ponto de vista organolético no vinho, encontrando-se em pequenas concentrações quando comparado com o ácido tartárico e málico (Tessini *et al.*, 2009). No entanto, devido à participação do ácido chiquímico na biossíntese de antocianinas, vários estudos propõem a determinação de ácido chiquímico como ferramenta para diferenciar diferentes variedades de vinho tinto (Mardones *et al.*, 2005).



Ácido chiquímico

Figura 1.4 - Estrutura química do ácido chiquímico (adaptado de Pullinger & Monteiro, 1988).

1.7 Acidez nos vinhos

Em enologia existem três conceitos de acidez que permitem descrever a composição ácida dos vinhos. As propriedades organoléticas de um determinado vinho dependem da acidez total, acidez fixa e da acidez volátil.

A acidez total é definida como a concentração da totalidade dos ácidos presentes na uva e no vinho, tituláveis a pH 7 excluindo o dióxido de carbono e a fração de ácido sulfuroso, independentemente da sua origem e natureza. Considera-se como acidez total a soma da acidez fixa e da acidez volátil (Curvelo-Garcia & Barros, 2015). Segundo o Regulamento (CE) n°

491/2009, o limite analítico estabelecido pela legislação portuguesa para a acidez total em vinhos é superior a 3,5 g/L expresso ácido tartárico ou superior a 466 mEq/L.

Segundo a definição da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), a acidez volátil é constituída pelos ácidos da série acética presentes nos vinhos no estado livre ou no estado salificado. Os compostos voláteis que constituem este tipo de acidez são produzidos na fermentação alcoólica e o seu teor aumenta, posteriormente, durante a fermentação maloláctica. É um parâmetro muito importante a medir, uma vez que o ácido acético pode encontrar-se em elevadas concentrações e destacar-se da matriz aromática do vinho. O teor de acidez volátil encontra-se regulamentado, com o intuito de evitar a comercialização de vinhos alterados ou impróprios para consumo. Pelo Regulamento (EU) 934/2019 é fixado o limite de 18 mEq/L para vinhos brancos e rosados, e de 20 mEq/L para vinhos tintos. A determinação da acidez volátil consiste na titulação dos ácidos voláteis separados do vinho por destilação.

A acidez fixa é determinada pela soma dos ácidos fixos, sendo o ácido tartárico e o ácido málico os mais importantes. Geralmente quanto maior for a acidez fixa menor é a acidez volátil porque as bactérias acéticas têm dificuldade em crescer em meios ácidos.

1.8 Compostos fenólicos nas uvas e no vinho

As uvas são uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas com outras frutas ou vegetais. Por ser a matéria-prima para produção de vinhos é muito importante conhecer o seu teor em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são determinantes para a qualidade dos vinhos, especialmente nos tintos. Entender a sua complexidade irá permitir o seu uso como critério para determinar a qualidade (Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários presentes nas uvas que podem ser transformados durante o processo de vinificação. Consoante o tipo de composto fenólico encontram-se em diferentes concentrações na polpa, película e grainhas. Durante o processo de vinificação, os vinhos tintos são expostos a todas as partes das uvas e por esse motivo a sua concentração em compostos fenólicos é maior quando comparado com os vinhos brancos. Nos vinhos tintos encontram-se em concentrações de 1-5 g/L e nos vinhos brancos em concentrações 0,2-0,5 g/L (Visioli *et al.*, 2020). Estes compostos nos vinhos são determinantes para as propriedades sensoriais, como por exemplo, para a aparência, cor, adstringência, acidez e sabor. Também são importantes na estabilidade dos vinhos na sequencia dos processos oxidativos, nomeadamente, no acastanhamento dos vinhos brancos e na oxidação dos vinhos tintos (Avizcuri *et al.*, 2016). Os compostos fenólicos podem ser classificados em flavonóides e não-

flavonóides. Do grupo dos flavonóides das uvas e dos vinhos destacam-se os flavanóis, flavonóis e as antocianinas (Figura 1.5). Ao grupo dos não-flavonóides pertencem os ácidos fenólicos e estilbenos (Figura 1.8 e 1.9). Os compostos fenólicos são muito diversificados, no entanto, os que mais determinam a qualidade do vinho são os ácidos fenólicos, os flavonóis, taninos e estilbenos (Merkytė *et al.*, 2020).

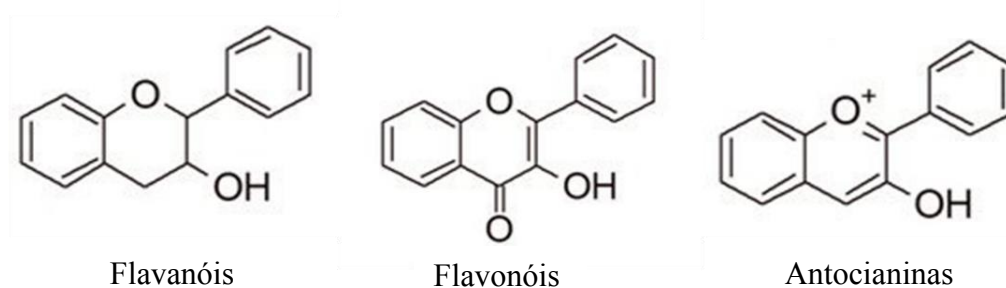


Figura 1.5 - Estrutura química dos compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos Flavonóides (adaptado de Merkytė *et al.*, 2020).

As antocianinas são flavonóides amplamente distribuídos pela natureza e responsáveis por todas as cores presentes nos frutos. Nas uvas de castas tintas, as antocianinas encontram-se nos vacúolos celulares da película e são as que contribuem com maior percentagem de compostos fenólico. São um constituinte importante na produção de vinhos tintos contribuindo para os parâmetros sensoriais e de coloração. A concentração de antocianinas encontra-se entre 90-400 mg/L nos vinhos tintos (Visioli *et al.*, 2020). As antocianinas encontradas do género *Vitis* são a pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A malvidina-3-glucósido é a mais abundante nas uvas. As antocianinas estão diretamente relacionados com a alteração da cor durante o processo de envelhecimento do vinho (Merkytė *et al.*, 2020).

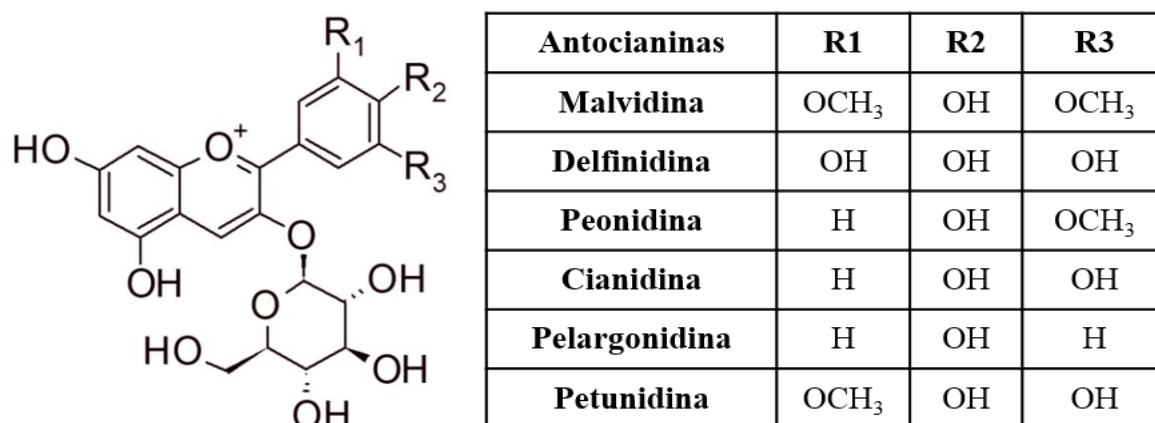


Figura 1.6 - Estrutura química das antocianinas (adaptado de Merkýtė *et al.*, 2020).

As catequinas são flavanóis presentes nas grainhas das uvas e são o principal composto fenólico responsável pelo sabor e adstringência nos vinhos. No entanto, este composto também se encontra em maior quantidade no extrato da película das uvas brancas sendo por isso um dos compostos maioritários no vinho branco (Jackson, 2008). A concentração de catequinas detetada em vinhos brancos jovens foi de 15 a 25 mg/L e em vinhos tintos jovens de 4 a 120 mg/L (Visioli *et al.*, 2020).

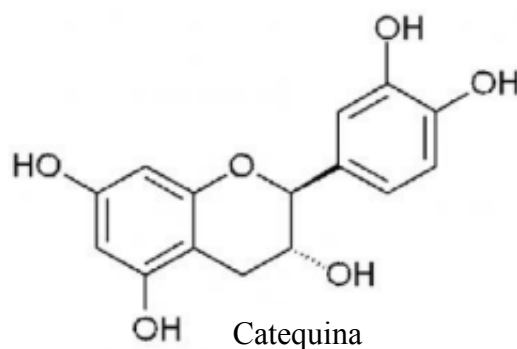
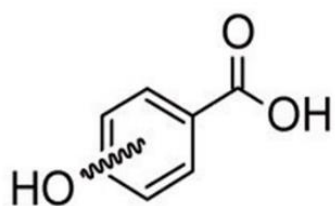


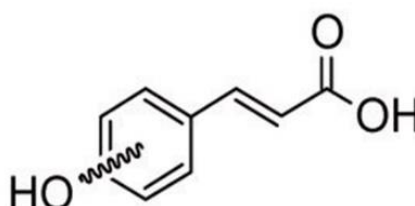
Figura 1.7 - Estrutura química da catequina (adaptado de Archela & Dall'Antonia, 2014).

Como mencionado anteriormente, o grupo não-flavonoide compreende os ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico e o ácido hidroxicinâmico) (Figura 1.8) e estilbenos. Encontram-se nos vinhos tintos em concentrações de 60 a 566 mg/L (Castaldo *et al.*, 2019). Os ácidos hidroxibenzoicos encontram-se nos vinhos tintos em concentrações de 218 mg/L (Jackson, 2008), sendo que os ácidos mais abundantes são o ácido gálico e o ácido vanílico. O

ácido gálico é considerado o fenólico mais importante em vinhos tintos sendo que a sua concentração ronda os 70 mg/L. Em vinhos brancos apresenta concentrações de 10 mg/L (Visioli *et al.*, 2020). Este ácido é conhecido pela sua contribuição adstringente (Sterneder *et al.*, 2021). Para fazer a caracterização varietal é comumente utilizada a relação entre ácido vanílico e ácido siríngico. A maior quantidade de um e a menor quantidade de outro permite distinguir diferentes variedades (Gerogiannis *et al.*, 2018).



Ácido hidroxibenzóico



Ácido hidroxicinâmico

Figura 1.8 - Estrutura química dos compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos não-flavonóides, nomeadamente, os ácidos fenólicos (adaptado de (Merkytė *et al.*, 2020)).

Nas uvas, os ácidos fenólicos mais abundantes são os ácidos cinâmicos que se encontram combinados com o ácido tartárico nos vacúolos das células das películas e da polpa. Para além de serem os ácidos mais abundantes nas uvas, são também o grupo predominante em vinhos brancos (Ferreira-Lima *et al.*, 2018). Estes compostos não se fazem notar nas características organolépticas, no entanto, desempenham um papel importante nas oxidações do mosto e do vinho que levam ao acastanhamento dos vinhos (principalmente nos vinhos brancos) e ao aparecimento de fenóis voláteis que causam alterações indesejáveis de aroma (Kanavouras *et al.*, 2020).

O teor de ácidos hidroxicinâmicos nas uvas varia consoante a casta. É na polpa e na película que se encontram a maioria destes ácidos, sendo que o que se encontra em maior abundância é o ácido cafeico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Nos vinhos, a concentração de ácidos hidroxicinâmico também é variável. Geralmente a sua concentração é maior em vinhos tintos (100 mg/L) do que em vinhos brancos (30 mg/L) (Visioli *et al.*, 2020). No entanto, há autores que constataram concentrações maiores em vinhos brancos do que em vinhos tintos (Gutiérrez-Escobar *et al.*, 2021).

Ainda no grupo dos não-flavonóides destaca-se o resveratrol, o principal estilbeno presente nas uvas e no vinho na forma de isômero *cis* e *trans* (Figura 1.8) (Merkytė *et al.*, 2020). O resveratrol é sintetizado nas uvas em consequência de stress ou alguma infecção microbiológica. Este composto também é produzido após a aplicação de alguns fitofármacos e pela exposição da luz UV (Peretti *et al.*, 2015). Os agentes clarificantes tem influencia e diminuem os teores de resveratrol (Gerogiannaki-Christopoulou *et al.*, 2006). Vários estudos revelam que o resveratrol apresenta uma correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a ocorrência de doenças cardiovasculares (Chudzińska *et al.*, 2021). É reconhecido pelas suas propriedades antioxidantes encontrando-se nos vinhos tintos em concentrações de 7 mg/L, em vinhos rosé com uma concentração de 2 mg/L e em vinhos brancos com uma concentração de cerca de 0,5 mg/L (Pastor *et al.*, 2019).

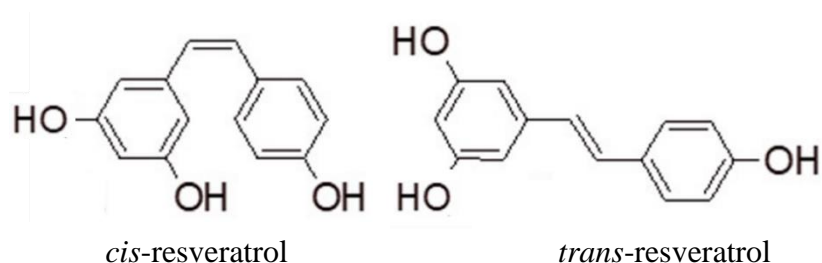


Figura 1.9 - Estrutura química do resveratrol (adaptado de ((Merkytė *et al.*, 2020)).

1.9 Atividade antioxidante em Vinhos

As uvas e o vinho são considerados grandes fontes de compostos fenólicos que existem na natureza. De acordo com a literatura, estes compostos na forma de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e resveratrol são os que apresentam maior atividade antioxidante (Broinizi *et al.*, 2007). A presença de antioxidantes encontra-se relacionada com a capacidade de melhorar a estabilidade, e consequentemente, a qualidade dos vinhos.

1.10 Métodos analíticos para determinação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos

A composição dos vinhos é caracterizada pela presença de diferentes compostos fenólicos e orgânicos em diferentes concentrações. Como já mencionado, cada composto desempenha um papel fundamental nas propriedades dos vinhos (Robles *et al.*, 2019). Dada a complexidade e importância destes compostos na qualidade das uvas e consequentemente dos vinhos, vários métodos tem sido descritos para se determinar e quantificar a sua presença nos mostos e nos vinhos (Coelho *et al.*, 2018). As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, principalmente na análise de matrizes complexas pela

eficácia de separação dos analitos presentes na amostra e pelo poder de resolução das colunas (Lanças, 2009). A técnica mais utilizada por diferentes investigadores é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Figura 1.10).

O principal objetivo desta técnica é separar individualmente os diferentes compostos presentes nas uvas e no vinho através da interação simultânea entre a amostra e duas fases, móvel (eluente) e estacionária (revestimento da coluna). Esta técnica conta com diferentes constituintes, nomeadamente, solvente, uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna cromatográfica, um detetor e um software que regista os dados.

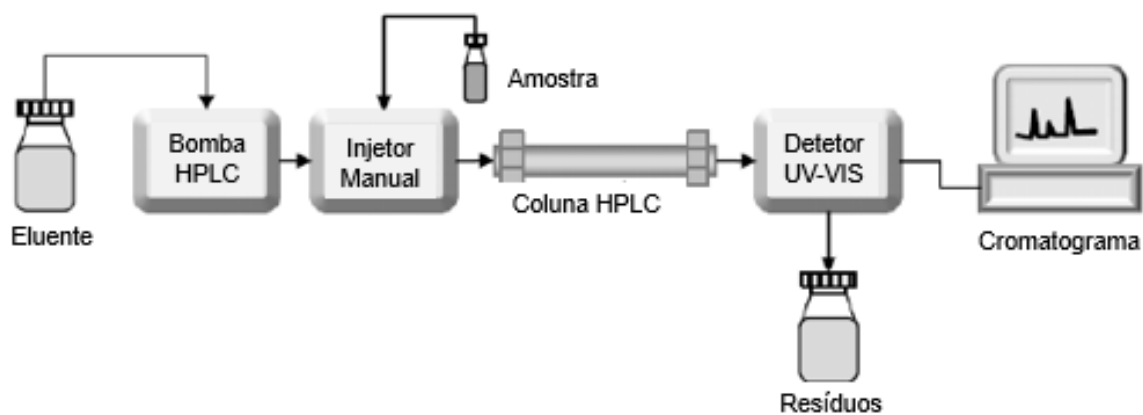


Figura 1.10 - Esquema geral do equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (adaptado de Czaplicki, 2013).

O eluente, também chamado de solvente ou fase móvel, é adicionado a um frasco apropriado e aspirado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. A bomba promove a circulação da fase móvel, a um determinado fluxo, ao longo do sistema cromatográfico. Nos sistemas de eluição isocrática o eluente mantém a sua composição constante ao longo de toda a análise. Nos sistemas de eluição por gradiente a eluição é realizada variando a composição da fase móvel durante uma análise (Fernando & Soysa, 2016). No percurso, a amostra injetada é introduzida na fase móvel mediante uma válvula de injeção e arrastada pela coluna cromatográfica (fase estacionária). As substâncias presentes na amostra devido às diferenças na estrutura molecular e aos distintos graus de afinidade com a fase móvel e estacionária permitem a separação cromatográfica (Sahu *et al.*, 2018). Deste modo, substâncias com maior afinidade com a coluna eluem por último e as com menor afinidade eluem primeiro. O efluente da coluna passa pelo detetor que deteta a presença de analitos eluídos. O sinal gerado pelo detetor é alcançado pelo software definido para o efeito e tratado em computador. Deste resulta um

cromatograma que evidencia a variação do sinal do detetor em função do tempo da análise. Nos cromatogramas estão diferentes sinais (picos), com um determinado tempo de retenção e com um espectro de absorção próprio. A análise do cromatograma consiste na identificação de cada pico por comparação de padrões analisados nas mesmas condições e pela quantificação do analito utilizando retas de calibração. A área de cada analito corresponde ao pico que é proporcional à concentração do analito na amostra injetada (Izquierdo-Llopart & Saurina, 2019).

Apesar de ser uma ótima técnica de separação não identifica compostos desconhecidos, ou seja, precisa de uma técnica complementar para identificação. Das várias técnicas que já existem, a espectrometria de massas é uma das mais usadas. O acoplamento entre estas duas técnicas LC/MS (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) tem um grande potencial na análise qualitativa e quantitativa (Lanças, 2009). A identificação dos compostos por esta técnica exige a sua ionização prévia. Na ionização uma das técnicas mais usada é a do eletrospray (Lanças, 2009).

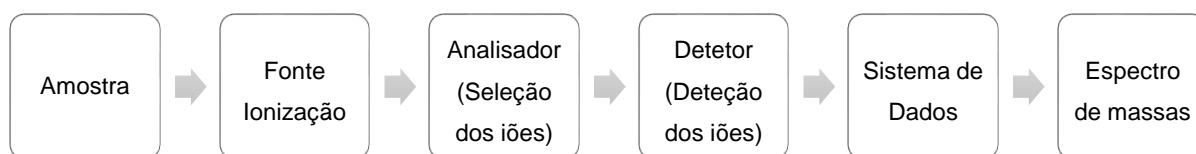


Figura 1.11 - Esquema geral das principais partes do espectrómetro de massas (adaptado de Lanças, 2013).

O espectrómetro de massa é utilizado como detetor do HPLC identificando eficazmente os analitos de interesse da amostra. O espectro de massa compreende uma fonte de iões, um analisador de massas, um detetor que trabalha em vácuo permitindo que os iões se movimentem sem colidir com outras espécies (Gross, 2004). A entrada do espectrómetro de massa transfere as amostras para a fonte de iões, onde as amostras são convertidas numa fase gasosa iónica. É o analisador de massas que separa e analisa as espécies iónicas sendo que depois o detetor analisa e amplifica a corrente de iões. Por fim, é o software que trabalha os dados e origina o espectro de massas (Zeki *et al.*, 2020). A espectrometria de massa é, deste modo, uma técnica que permite identificar substâncias químicas através da separação de iões gasosos que são produzidos através de campos elétricos e magnéticos aplicados. A identificação dá-se considerando a razão massa/carga (Scott, 2012).

1.11 Objetivos práticos do estudo

A composição físico-química das uvas e dos vinhos do Algarve tem sido pouco estudada. O interesse em caracterizar as uvas e vinhos do Algarve contribuiu para se otimizarem métodos capazes de determinar com rapidez e de forma simples ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Estes compostos merecem atenção visto que fornecem aos vinhos características organoléticas que os tornam únicos.

O presente trabalho tem como principais objetivos:

- Realização de análises físicas e químicas às uvas das castas autóctones da região do Algarve;
- Otimizar um método analítico isocrático de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação do ácido cítrico, succínico, chiquímico, cafeico, gálico e vanílico, bem como catequina, resveratrol e antocianinas em uvas e vinhos;
- Quantificar os compostos, cujos métodos foram otimizados, nas uvas e nos vinhos;
- Utilização do LC-MS como forma de identificar compostos das uvas e vinhos;

O trabalho decorreu no laboratório de Enologia, Química e de Processamento do Departamento de Engenharia Alimentar do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve e também contou com a colaboração do Centro de Ciências do Mar para as análises por LC-MS.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

As uvas utilizadas no presente trabalho foram das castas Negra Mole e Crato Branco, colhidas no final das vindimas (1 de outubro) e transportadas numa geleira desde a vinha ao laboratório de enologia da Universidade do Algarve. À chegada ao laboratório as uvas foram armazenadas numa câmara frigorífica a 5°C. As uvas da casta Crato Branco foram colhidas na zona de Loulé (Quinta da Tôr) e as uvas da casta Negra Mole foram colhidas na zona de Alcantarilha, responsabilidade da CVA.

Além das amostras de uvas fornecidas também foram adquiridas amostras de vinhos algarvios (3 amostras de vinho monocasta Negra Mole e 2 amostra de vinho monocasta Crato Branco) produzidos a partir das castas autóctones da região do Algarve. Os vinhos adquiridos foram: Herdade Barranco do Vale Negra Mole Reserva Rosé (2019) (HBV), Paxá Negra Mole (2019) (Paxá), Morgado do Quintão Clarete Negra Mole Tinto (2020) (MQNM), Morgado do Quintão Crato Branco (2018) (MQCB) e Quinta da Penina Branco (2021) (QP).

2.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos gerais foram realizados no laboratório de enologia do Instituto Superior de Engenharia e incidiram sobre a determinação dos sólidos solúveis (°Brix), pH, densidade, humidade, dimensão e peso das uvas.

2.2.1 Determinação dos sólidos solúveis

A determinação dos sólidos solúveis foi efetuada no refratómetro de bancada Abbe (OPTECH, Munich, Alemanha). Para realizar esta medição usaram-se 10 bagos de cada casta escolhidas aleatoriamente do cacho, esmagados e o sumo foi utilizado para as diferentes leituras.

2.2.2 Determinação do pH e densidade

A medição do pH e da densidade foi realizada em triplicado. O pH foi determinado pelo método potenciométrico recorrendo a um medido de pH Crison (Meter GLP 21), usando os padrões pH 7 e pH 4 para calibrar. Um densímetro digital (Mettler Toledo DA-110M) foi usado para determinar a densidade fazendo passar o líquido diretamente no tubo de medição após se proceder à calibração com água destilada.

2.2.3 Determinação da humidade

A humidade foi determinada utilizando 5,2 g de película, 1 g de grainha e 5,4 g de polpa de uva secas a 120 °C num secador de infravermelhos (*Mettler IP16*) com balança (*Mettler PM 100*), ambos da Mettler Toledo (Zurich, Suíça). As medições foram realizadas em triplicado.

2.2.4 Caracterização física das uvas

A caracterização física das uvas foi realizada através da medição do seu diâmetro equatorial e altura usando um paquímetro. Posteriormente os 10 bagos de cada casta foram pesados numa balança analítica de precisão (*Ohaus Pioneer, PA214*, EUA) e registado o seu peso e dimensão. Fizeram-se três repetições para cada casta. Para a casta tinta foram novamente pesados 10 bagos de uvas, escolhidas aleatoriamente dos cachos, e determinado o peso das grainhas, películas e polpa na mesma balança analítica.

2.3 Preparação dos extratos alcoólicos das uvas

O mosto das uvas foi obtido por esmagamento de 10 bagos de uvas inteiras, escolhidos aleatoriamente de diferentes cachos da mesma casta. Após o esmagamento das uvas foram adicionados 10 ml de etanol para se obter o extrato alcoólico. Os gobelés, contendo o mosto, foram tapados com parafilme, revestidos em papel alumínio para proteger da luz, e identificados com nome da casta, data e número da amostra. Para as uvas de casta tinta recorreu-se ao mesmo método para se obter extratos alcoólicos das películas, grainhas e polpa, separadamente. Posteriormente as amostras foram filtradas e congeladas em pequenos tubos de ensaio de plástico transparente à temperatura de -19,7 °C.

2.4 Preparação das amostras para injeção no HPLC

Antes de se proceder a análise dos ácidos orgânicos no HPLC, os diferentes extratos alcoólicos foram novamente diluídos e filtrados. Os extratos alcoólicos dos macerados das uvas, da polpa e das grainhas foram diluídos numa proporção de 1:20 (V/V). Os extratos alcoólicos da polpa e dos vinhos foram diluídos numa proporção de 1:10 (V/V). Os vinhos foram diluídos numa proporção de 1:10 (V/V). As amostras foram homogeneizadas num vórtex. A filtração foi realizada com recurso a membranas filtrantes com uma porosidade de 0.45 µm. Seguidamente, as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O procedimento foi realizado em triplicado para cada amostra.

2.5 Reagentes e Solventes utilizados

Os reagentes utilizados na parte experimental encontram-se descritos na tabela 2.1, assim como o respetivo grau de pureza e marca de fabricante. Os reagentes utilizados

correspondem aos ácidos orgânicos e compostos fenólicos disponíveis no laboratório de Enologia do Instituto Superior de Engenharia. No decorrer dos trabalhos experimentais foi utilizada água ultrapura (base de todas as diluições), retirada de um sistema de purificação de água *HYDROLAB* modelo HLP5 com eficiência de 5 L/h.

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados e respectivas especificações do fabricante.

Compostos	Grau de pureza (%)	Marca
Etanol	>99,9	Carlo Erba
Acetonitrilo	>99,9	Chem Lab
Ácido fosfórico	85-90%	Fluka
Ácido cítrico	>99,5	Chem Lab
Ácido succínico	>99	Scharlau
Ácido chiquímico	>97	TCI
Ácido gálico	>98	TCI
Ácido vanílico	>97	Fluka
Ácido cafeico	>98	Sigma
Catequina	>95	TCI
Malvidina-3-glicósido	95-97,5	Sigma-Aldrich
<i>trans</i> -resveratrol	>98	Sigma Aldrich

2.6 Preparação das soluções

2.6.1 Soluções Padrão de Calibração

Foram preparadas em balões volumétricos de $100,0 \pm 0,1$ ml soluções-mãe individuais de cada padrão. As soluções-mãe foram preparadas pela dissolução do sólido de cada analito comercial adquirido pelo laboratório de Enologia em soluções hidroalcoólicas contendo 15 % de etanol (C_2H_5OH) (concentração similar à encontrada nos vinhos) e soluções 100 % alcoólicas, à exceção dos ácidos orgânicos que foram diluídos em água ultrapura.

A escolha das concentrações usadas para preparar as soluções-mãe de cada analito foram selecionadas na bibliografia em métodos semelhantes que já se encontravam desenvolvidos e otimizados. As soluções- padrão de ácido cítrico, succínico e chiquímico foram preparadas segundo a descrição de Ivanova-Petropulos *et al.*, (2020) com concentrações de 1 g/L e 0,1 g/L, respetivamente. As soluções de ácido gálico e vanílico foram preparadas com concentrações de 1 g/L como se encontra descrito por Izquierdo-Llopart & Saurina, (2019). O

ácido cafeico e catequinas foram preparadas com concentrações de 0,10 g/L como mencionam Dias *et al.*, (2016) e Belmiro *et al.*, (2017). O resveratrol e as antocianinas, pela pequena quantidade disponível no laboratório, foram preparados em concentrações de 0,01 g/L e 0,002 g/L, respetivamente.

Posteriormente, os padrões de calibração foram preparados a partir de soluções mãe e das soluções intermédias previamente preparadas. Para este efeito foram pipetados diversos volumes para balões volumétricos de 100 ml \pm 0,1 ml e diluídos em água ultrapura.

Para determinar quais as gamas de concentração a preparar para cada solução padrão de calibração foram, novamente, consultados alguns métodos já desenvolvidos. Segundo Ivanova-Petropulos *et al.*, (2020), as soluções padrão de ácido cítrico e succínico utilizadas para validar o método foram preparadas num gama de concentrações de 0,01 a 5 g/L. Tessini *et al.*, (2009) mencionam concentrações de ácido chiquímico entre 1,0 – 150 mg/L. Prasongsidh & Skurray, (1998) menciona concentrações para o ácido gálico compreendidas entre 1 mg/L e 50 mg/L. O ácido vanílico e o cafeico foram preparados com concentrações compreendidas entre 0,05 e 50 mg/L segundo Mendoza *et al.*, (2011). Izquierdo-Llopart & Saurina (2019) utilizaram concentrações compreendidas entre 0,05 e 20 mg/L para preparar os padrões de calibração de catequina e resveratrol. As soluções padrão de calibração para as antocianinas foram preparadas numa gama de concentração entre 0,4 e 25 mg/L como descreve Nyman & Kumpulainen, (2001). No entanto, estas concentrações eram demasiado pequenas e não se conseguiu obter uma reta de calibração. Foi necessário ir aumentando e experimentando concentrações mais elevadas nas soluções de calibração para se obter uma adequada reta de calibração.

As gamas de concentração de cada solução padrão de calibração dos ácidos orgânicos e compostos fenólicos, resveratrol e antocianinas encontra-se descrito na tabela 2.2. De salientar que todas as soluções-mãe e soluções intermédias foram preparadas no próprio dia em que se procedeu à sua leitura no HPLC.

Tabela 2.2 - Gama de concentração de cada analito utilizado para construir as curvas de calibração de cada padrão.

Analitos	Gama de concentração (mg/L)
Ácido cítrico	500,0-1000,0
Ácido succínico	500,0-1000,0
Ácido chiquímico	3,0-20,0
Ácido gálico	2,0-30,0
Ácido vanílico	2,0-40,0
Ácido cafeico	10,0-50,0
Catequina	2,0-20,0
Malvidina-3-O-glicósido	5,0-9,0
<i>trans</i>-resveratrol	0,2-2,0

2.6.2 Fase móvel

No sistema isocrático disponível só foi possível trabalhar com 1 eluente de cada vez sempre com fluxo de 1 ml por minuto. Contudo para os diferentes compostos analisados foram testados vários eluentes. O primeiro eluente A, foi uma solução aquosa de limpeza, preparada com acetonitrilo e água ultrapura Mili-Q (*Mili-Q academic Milipore*) numa proporção de 80:20 (V/V), respetivamente. O eluente B foi composto por acetonitrilo, ácido fosfórico (H_3PO_3) e água ultrapura numa proporção de 0,1:0,1:99,8 (V/V). O eluente C foi preparado com acetonitrilo, ácido fosfórico e água ultrapura numa proporção de 35:0,1:65 (V/V), respetivamente. O eluente D preparado com acetonitrilo, ácido fosfórico e água ultrapura numa proporção de 15:0,1:85 (V/V) e o eluente E preparado numa proporção de 20:0,1:80 (V/V). O pH dos diferentes eluentes foi corrigido para 2, sempre que necessário, com algumas gotas de ácido fosfórico. Os eluentes antes de utilizados foram filtrados a vácuo através de uma membrana de Nylon de porosidade de 0,45 μm e desgaseificadas num banho de ultrassons durante 15 minutos.

Para identificar e determinar qual o melhor eluente a utilizar foram realizados vários ensaios, até porque como já mencionado, o equipamento não permite o uso de gradientes. Prepararam-se diversos eluentes com diferentes concentrações de acetonitrilo e ácido fosfórico para perceber qual deles separava os picos cromatográficos nas amostras injetadas. Desta forma, conclui-se que para eluir ácidos orgânicos nas amostras, o melhor eluente seria o B, para compostos fenólicos o melhor eluente seria o C e para o resveratrol e antocianinas seria o D e

E, respetivamente. Na figura 2.1, é possível constatar dois exemplos de ensaios realizados para determinar qual o melhor eluente para separar os picos cromatográficos de antocianinas nas amostras.

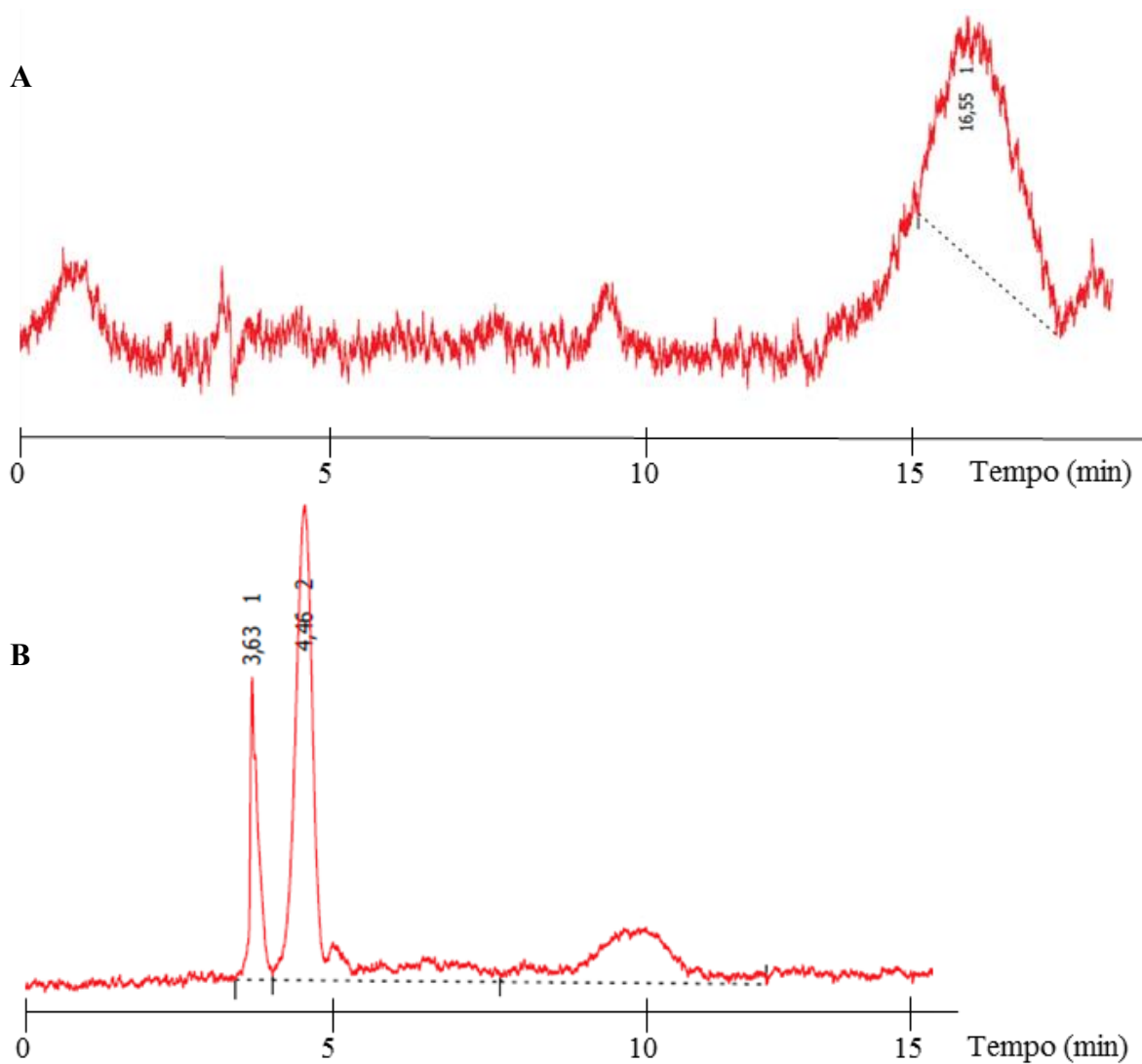


Figura 2.1 - Cromatograma obtido para um macerado de uvas tintas; (A) Cromatograma de um macerado de uvas tintas eluído com acetonitrilo a 15%; (B) Cromatograma de um macerado de uvas tintas eluído com acetonitrilo a 25%.

Neste caso particular optou-se por injetar um macerado de uvas tintas da casta Syrah porque como as uvas tem menores dimensões, acaba por ter maior percentagem de película e por isso maior concentração de antocianinas. Assim foi injetada a amostra e verificou-se que o eluente com acetonitrilo a 25% é o eluente capaz de fazer eluir as antocianinas presentes no macerado e, portanto, será o eluente mais indicado para quantificar este composto nas uvas e nos vinhos tintos (figura 2.1B).

2.7 Equipamento e condições cromatográficas para análise por HPLC

A análise dos diferentes compostos presentes nas uvas e nos vinhos foi realizada com recurso a um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) *HP HEWLETT PACKARD serie 1050* (“*HP 1050 Series Pumping Systems*”), equipado com uma bomba isocrática; um injetor com sistema manual de injeção e volume fixo de 20 μl , acoplado a um detetor de absorção UV-Vis *ECOM (ECD 2000)* e uma estação de controlo de dados *Software CLARITY 8.4 (Clarity Chromatography Station)* (nº serie do Software 98- 14033). Foi utilizado uma coluna *NUCLEOSIL® RP- C18* com partículas de 3 μm (4,6 mm x 200 mm).

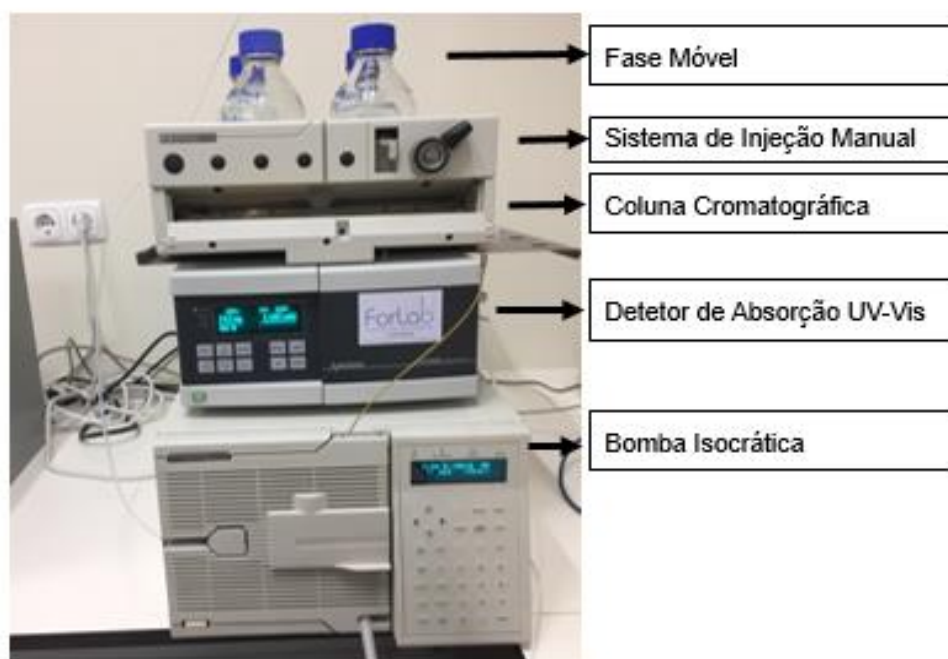


Figura 2.2 - Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizado no trabalho.

2.8 Determinação do comprimento de onda ótimo para cada composto

A escolha do comprimento de onda ótimo para cada composto foi feita após consulta bibliográfica. Segundo Gutiérrez-Escobar *et al.* (2021), Peixoto *et al.* (2018) e Zhang *et al.* (2013) para detetar ácidos orgânicos utilizaram comprimentos de onda de 212 nm. Os compostos fenólicos foram detetados a 280 nm, o resveratrol a 370 nm e as antocianinas a 520 nm. Na figura 2.3 apresentam-se dois exemplos de cromatogramas de um vinho tinto (MQNM) (A) e de uvas Síria/Crato Branco (B) detetados a 212 nm. Em ambos os cromatogramas os picos são bem resolvidos indicando que este é um bom comprimento de onda para quantificar ácidos orgânicos nas amostras injetadas.

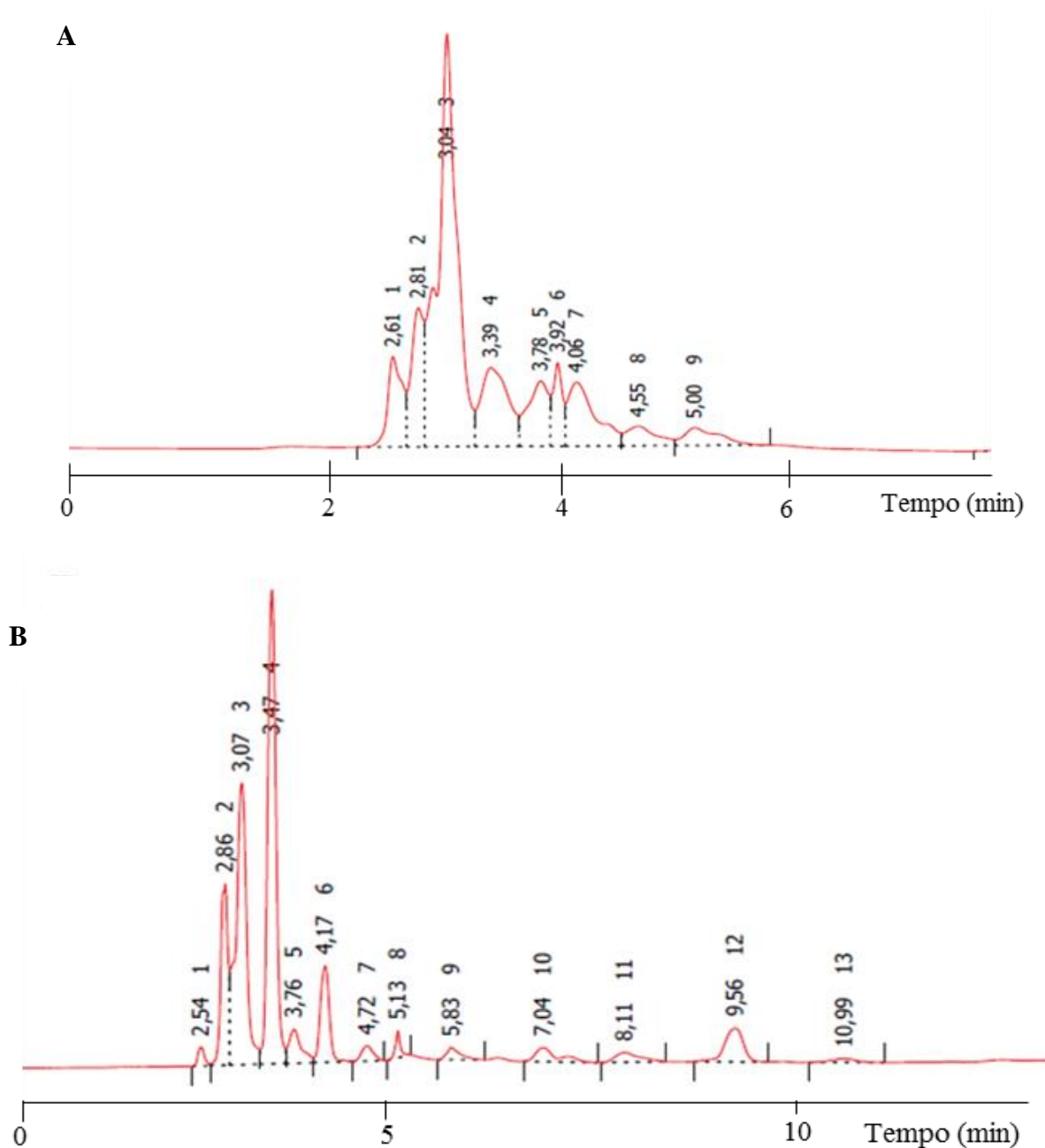


Figura 2.3 - Cromatograma de um vinho e de um extrato alcoólico de uva obtidos por HPLC num espectro de absorção de 212 nm; (A) Cromatograma de um vinho tinto (MQNM); (B) Cromatograma de um extrato alcoólico de uva Crato Branco.

Para perceber se os restantes comprimentos de onda eram adequados para identificar os compostos injetaram-se diferentes amostras de extrato alcoólico de uvas tintas e brancas, extratos alcoólicos das películas, grainhas e polpa das uvas e vinhos para cada um dos comprimentos de onda sugeridos na bibliografia. A figura 2.4 mostra dois cromatogramas correspondente às antocianinas presentes nas películas das uvas de Negra Mole (A) e às uvas inteiras de Negra Mole (B) detetadas a 520 nm.

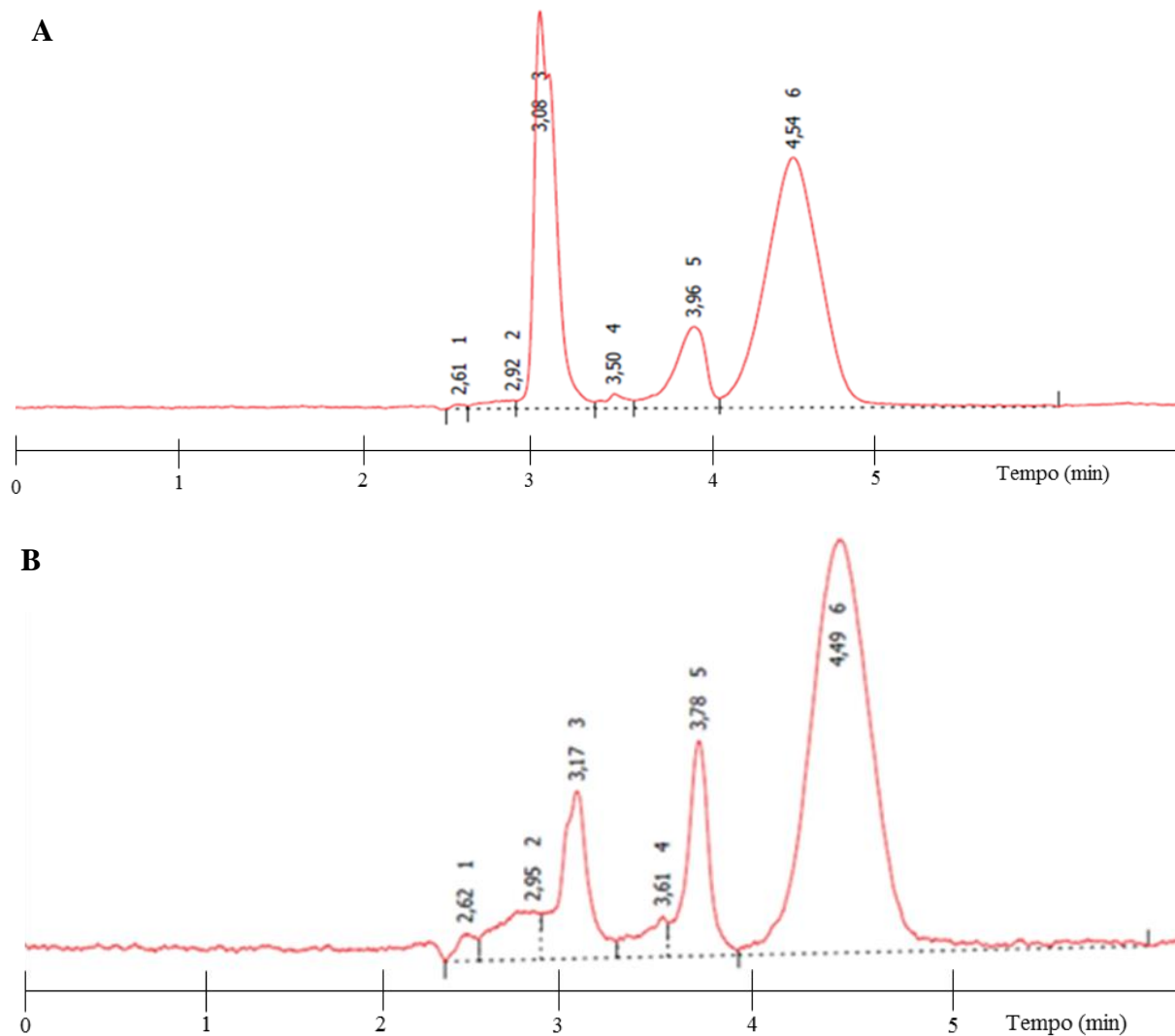


Figura 2.4 - Cromatograma de um extrato alcoólico da casta Negra Mole obtido pela análise de HPLC num espetro de absorção de 520 nm; (A) Cromatograma de um extrato alcoólico de película de uva Negra Mole; (B) Cromatograma de um extrato alcoólico de uvas inteiras de Negra Mole.

Após se verificar que os compostos presentes nas amostras eram detetados nestes comprimentos de onda e os picos obtidos eram bem resolvidos injetaram-se os padrões individualmente. Diferentes autores sugerem que o resveratrol é detetado a um o comprimento de onda de 370 nm, no entanto, não se verificaram picos bem resolvidos neste comprimento de onda. Após alguns ensaios verificou-se que o melhor comprimento de onda para detetar o resveratrol foi a 410 nm. Assim, as determinações dos diferentes compostos foram realizadas a 4 comprimentos de onda, 212 nm, 280 nm, 410 nm e 520 nm. O ácido cítrico, succínico e chiquímico foram determinados a 212 nm. O ácido gálico, vanílico, cafeico e catequinas foram determinados a 280 nm. O resveratrol foi determinado a 410 nm e as antocianinas a 520 nm. A

figura 2.5 corresponde a diferentes cromatogramas obtidos por HPLC de três padrões diferentes a 280 nm.

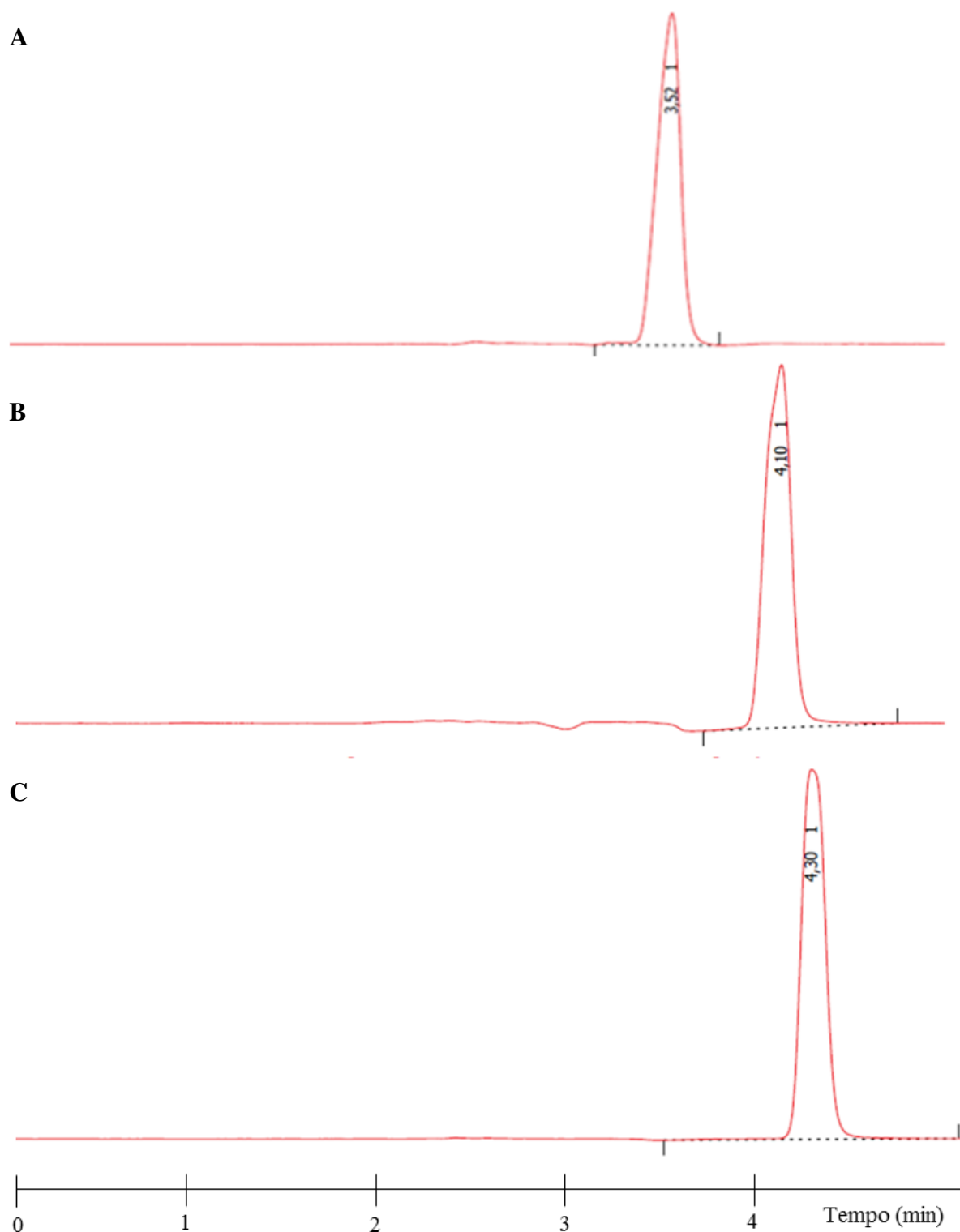


Figura 2.5 - Cromatograma de três padrões obtidos por HPLC num espectro de absorção de 280 nm; (A) Cromatograma do padrão de catequina com pico cromatográfico aos 3,52 min; (B) Cromatograma do padrão ácido cafeico com pico cromatográfico aos 4,10 min; (C) Cromatograma do padrão de ácido vanílico com pico cromatográfico aos 4,30 min.

2.9 Análise dos compostos

A quantificação dos ácidos orgânicos, compostos fenólicos, resveratrol e antocianinas presentes nas uvas das castas autóctones e nos vinhos algarvios foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção com os padrões individuais injetados exatamente nas mesmas condições. A figura 2.6 apresenta os cromatogramas obtidos para análise de uma solução padrão do ácido cítrico e de um vinho branco no comprimento de onda de 212 nm. É possível visualizar na figura 2.6A que o pico do ácido cítrico surge bem resolvido ao minuto 6,53 e que o mesmo pico surge na amostra injetada com mesmo tempo de retenção e, portanto, conseguiu-se identificar a presença deste composto no vinho branco (MQCB) (figura 2.6B).

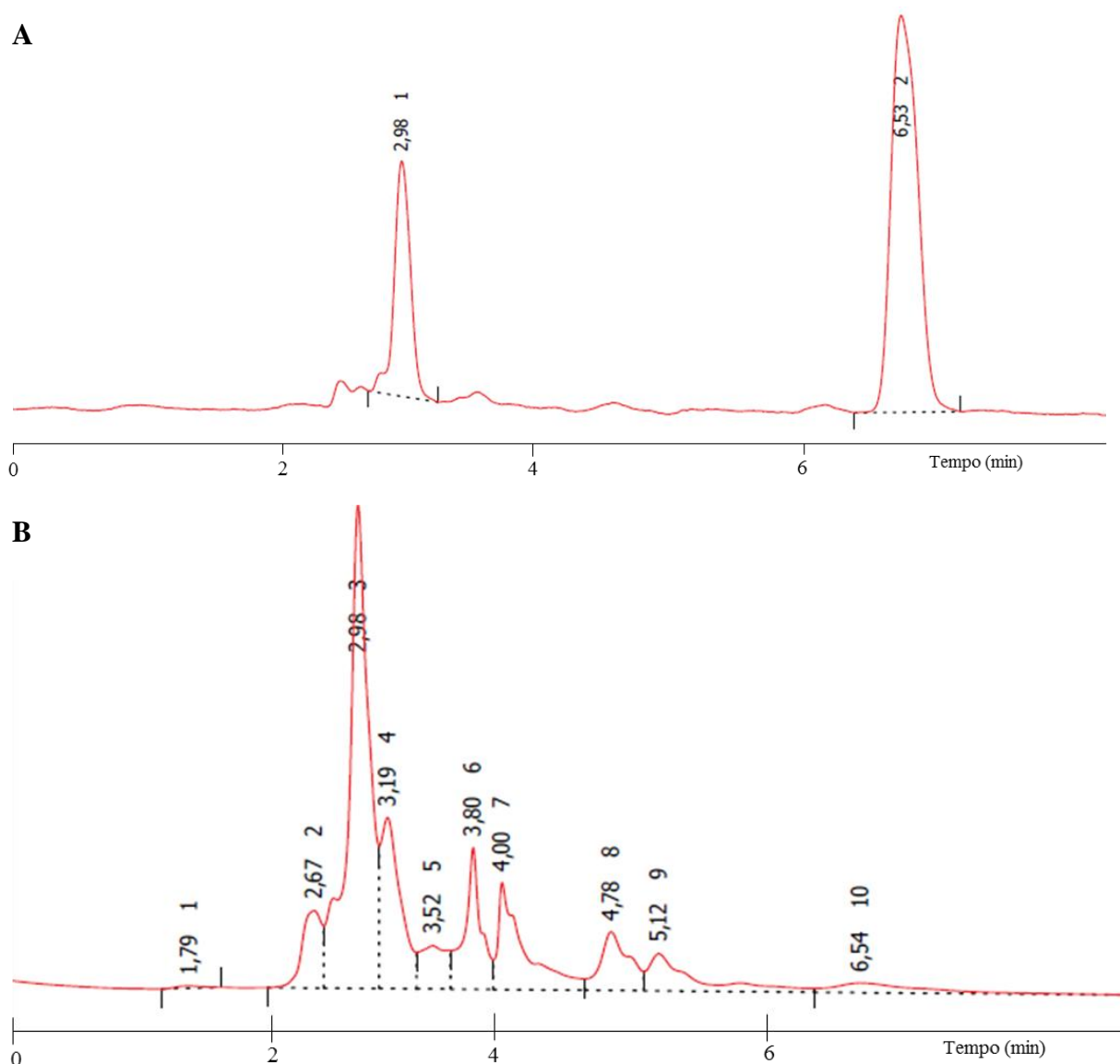


Figura 2.6 - Cromatogramas obtidos da análise de HPLC; (A) Cromatograma obtido de uma solução padrão contendo o ácido cítrico com detecção a 212 nm; (B) Cromatograma obtido da injeção de um vinho branco (MQCB) com detecção a 212 nm. Volume da amostra injetado 20 µl; fluxo 1 ml/min; eluente B.

O limite de detecção (LD) refere-se à menor quantidade de um analito presente numa amostra que pode ser detetado, mas não necessariamente quantificado enquanto o limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico corresponde à menor quantidade de um determinado analito presente numa amostra. O limite de quantificação pode ser determinado considerando três vezes o limite de detecção ($LQ = 3 \times LD$) (Badocco *et al.*, 2014). Para as antocianinas determinou-se que o limite de detecção, ou seja, a menor concentração deste presente na amostra é cerca de 0,002 g/L e, portanto, o limite de quantificação é de 0,006 g/L. Os limites dos restantes analitos foram determinados de acordo o que se encontra reportado na bibliografia (Paulo *et al.*, 2011; Šeruga *et al.*, 2011).

2.10 Identificação dos compostos fenólicos pelo sistema LC-MS

As amostras foram analisadas num LC-MS *Thermo Scientific ultimate 3000 UHPLC* com *Waters Acquity Premier BEH* e coluna C18 (2,1×50 mm, 1,7 mm). A fase móvel foi constituída por água (A) e acetonitrilo (B) contendo 0.1% de ácido fórmico. O gradiente (V/V%) iniciou com 25% de acetonitrilo durante 2 minutos tendo aumentado linearmente para 90% em 5 minutos. Este foi mantido por mais 5 minutos e voltou novamente para os 25 % de acetonitrilo em meio minuto. A sua composição foi mantida por mais 3,5 minutos até à corrida seguinte. O fluxo utilizado na fase móvel foi de 0,3 ml/min e o volume injetado de 10 µL. A análise de massa foi determinada num espectrómetro de massa *Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Bremen, Germany)* com uma fonte de ionização *Heated EletroSpray (HESI-II)*. A informação foi obtida usando polaridade positiva e negativa. A análise por LC-MS foi realizada em “Full scan” tendo sido a faixa de massa selecionada (m/z) compreendida entre 100,00 e 1500,00. A análise dos resultados obtidos do LC-MS foi realizada com recurso ao programa *Xcalibur 4.1 (Thermo Scientific, Bremen, Germany)* e a identificação dos diferentes compostos nas amostras realizadas com o programa *Compound Discoverer 3.3 (Thermo Scientific, Bremen, Germany)*.

2.11 Determinação da atividade antioxidante dos vinhos do Algarve

2.11.1 Método ABTS^{•+}

A atividade antioxidante foi determinada utilizando como oxidante o radical ABTS^{•+} e segundo o método descrito em Santos *et al.* (2014) com algumas modificações. A solução de ABTS^{•+} foi preparada misturando 7 mM de ABTS e 140 mM de persulfato de potássio. A solução foi guardada no escuro e à temperatura ambiente para reagir durante 16 h antes de ser utilizada. Posteriormente, o ABTS^{•+} foi diluído em etanol até se conseguir uma leitura de absorvância de 0.680 e 0.720 a 734 nm (1:20-1:50 (V/V)). Juntou-se 30 µl de amostra e 3 ml

de ABTS^{•+} e colocou-se a solução a incubar à temperatura de 30 °C. Os valores de absorvância das amostras foram lidos a 734 nm depois de 6 minutos no escuro. Como branco foi utilizado etanol. As leituras foram realizadas em triplicado. A percentagem de diminuição da absorvância a 734 nm (% inibição) foi calculada pela fórmula: $I = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$, onde $I =$ ABTS^{•+} percentagem de inibição, $A_B =$ absorvância do branco (t=0 min) e $A_A =$ absorvância da amostra de vinho no fim da reação (t=6 min) (Paixão *et al.*, 2007).

2.11.2 Teor de fenóis totais (FT)

A análise de compostos fenólicos presentes nos vinhos Algarvios foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (FC) descrito em Curvelo-Garcia *et al.*, (1981) com algumas modificações. As medidas das absorvâncias e as concentrações das soluções padrão de ácido gálico permitiram obter uma curva de calibração e possibilitar a determinação da concentração de fenólicos nas amostras de vinhos algarvios. A curva de calibração foi preparada a partir de 0, 1, 2, 3, 5, 8 e 10 ml de solução padrão de ácido gálico ao qual foi adicionado 5 ml de reagente FC (Capítulo VI Anexo III). No que respeita aos vinhos, foi utilizado 1 ml de amostra (adequadamente diluída), 20 ml de carbonato de sódio 20% e 5 ml do reagente FC. As absorvâncias dos padrões e das amostras foram lidas a 765 nm depois de 2 h de reação à temperatura de 24 °C. As leituras foram realizadas em triplicado. Foram obtidos resultados com elevada reprodutibilidade para os padrões ($r^2 > 0,9998$) e as amostras. Os valores foram determinados pela equação da reta de calibração ($y = 0,0099x - 0,002$, $r^2 = 0,9998$) e expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) l⁻¹ (Paixão *et al.*, 2007).

2.12 Análise Estatística

Todas as medições foram realizadas em triplicado. Os resultados das medições são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre grupos de amostras foram determinadas usando uma análise de variância unifactorial. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística de todos os resultados e a elaboração dos gráficos foram realizadas com recurso ao programa IMB SPSS, e Microsoft Excel 365.

3. Resultados e Discussão

3.1 Características físico-químicas das uvas de castas autóctones na região do Algarve.

No sentido de avaliar as características físico-químicas das duas castas foi feito contacto com um produtor da Quinta da Tôr em Loulé que disponibilizou a vinha para recolher as uvas pretendidas da casta Crato Branco e de outras castas disponíveis para comparação. Os cachos de uva Negra Mole foram disponibilizados por um contacto na Adega Cooperativa de Lagoa. As análises físico-químicas foram realizadas às uvas de cada casta e ao extrato alcoólico obtido dessas mesmas uvas. Os resultados obtidos dos parâmetros físico-químicos encontram-se descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Características físico-químicas das uvas de castas autóctones da região do Algarve.

Amostra	Massa (g)	Diâmetro equatorial (mm)	Altura (mm)	pH	Brix	Densidade do sumo das uvas (g/cm ³)
Crato Branco	23,9 ^a ± 1,2	14,6 ^a ± 0,01	16,8 ^a ± 0,05	3,63 ^a ± 0,02	25,5 ^a ± 0,05	1,1028 ^a ± 0,0001
Negra Mole	29,7 ^b ± 1,9	15,6 ^a ± 0,05	16,1 ^a ± 0,05	3,38 ^b ± 0,06	35,3 ^b ± 0,1	1,0939 ^b ± 0,0010

Os resultados correspondem à média e desvio padrão de três repetições, sendo que para cada repetição se utilizou 10 bagos escolhidos aleatoriamente de diferentes cachos de cada casta. Em cada coluna, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) ($n=3$).

Das castas autóctones estudadas, a casta que apresentou menor massa e menor diâmetro equatorial foi a Crato Branco sendo também a casta que apresentar menor teor em sólidos solúveis (grau Brix). Contrariamente, a casta Negra apresenta, de forma geral, maiores dimensões e maior teor de sólidos solúveis. Numa análise estatística foi possível determinar que não existem diferenças significativas entre a casta Crato Branco e Negra Mole quanto à altura e diâmetro dos bagos das uvas. Contudo, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas castas quanto aos restantes parâmetros físico-químicos determinados.

3.2. Curva de Calibração

As construções das curvas de calibração foram realizadas a partir de pelo menos cinco soluções-padrão com diferentes concentrações obtidas de soluções-mãe de cada analito como se encontra descrito no ponto 2.6. As curvas de calibração obtidas por HPLC para cada composto encontram-se nos Anexo I e II.

As equações das retas de calibração obtidas, assim como o coeficiente de determinação (r^2) de cada umas das retas encontram-se apresentadas na tabela 3.2. De acordo com a referida

tabela verifica-se que os resultados obtidos apresentam pouca variação, uma vez que os valores de coeficiente de determinação se encontram muito próximos de 1.

Tabela 3.2 - Curva de calibração obtidas para cada analito.

Analito determinado	Gama de Concentrações de padrões de Calibração (mg/L)	Equação da Reta	Coefficientes de determinação (R ²)	Tempo de Retenção (min)	λ Abs (nm)
Ácido cítrico	500,0-1000,0	Y=583,17x-1,5983	0,999	6,38	212
Ácido succínico	500,0-1000,0	Y=317,38x+1,9582	0,999	7,44	212
Ácido chiquímico	3,0-20,0	Y=42,485x-2,2309	0,999	4,69	212
Ácido gálico	2,0-30,0	Y=23,398x+14,859	0,999	3,17	280
		Y=2,9335x+1,7075	0,999		
Ácido vanílico	2,0-40,0	Y=15,337x+5,2413	0,999	4,29	280
		Y=1,7245x+1,6341	0,999		
Ácido cafeico	10,0-50,0	Y=28,702x-10,534	0,999	4,13	280
		Y=30,865x-19,881	0,998		
Catequina	2,0-20,0	Y=6,2367-2,2041	0,998	3,46	280
		Y=4,944x-2,3014	0,998		
Malvidina-3-O-glicósido	5,0-9,0	Y=9,9605x+0,4319	0,999	4,29	520
		Y=5,9517x+0,2067	0,999		
<i>trans</i> -resveratrol	0,2-2,0	Y=6,1391x+0,2223	0,998	3,70	410

As curvas de calibração para os ácidos orgânicos foram obtidas pela dissolução do analito em água ultrapura. As curvas de calibração dos compostos fenólicos foram obtidas numa mistura etanol- água 15:85 (azul) e numa mistura 100% etanol (vermelho).

Como já mencionado, foram elaboradas diferentes curvas de calibração com diferentes concentrações de padrão e, por regressão linear, obtiveram-se as equações das retas no modelo $y=ax+b$ (tabela 3.2), que foram utilizadas para o cálculo dos teores dos diferentes compostos, substituindo-se a varável “x” pela área do pico dos compostos obtidos por HPLC.

3.3 Determinação dos diferentes compostos nas uvas e vinhos

A identificação dos ácidos orgânicos e compostos fenólicos presentes nas castas autóctones e nos vinhos produzidos na região foi realizada por HPLC a partir do tempo de retenção e área obtido para o padrão de cada composto. Desta forma, conseguiu-se quantificar nas uvas e nos vinhos ácidos orgânicos, compostos fenólicos e antocianinas em comum. A figura 3.1 é um exemplo de perfil de ácidos orgânicos presentes nas uvas Negra Mole e nos vinhos, obtidos a partir desta, identificados por HPLC.

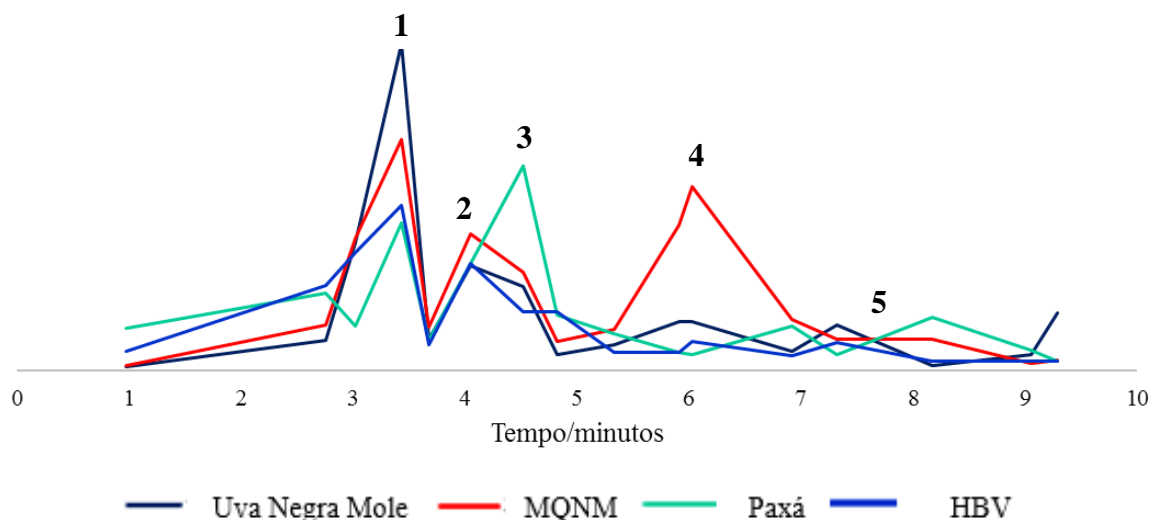


Figura 3.1 - Ácidos orgânicos presentes nas uvas e nos vinhos produzidos a partir da casta Negra Mole (HPLC). 1-ácido tartárico, 2- ácido málico, 3-ácido láctico, 4-ácido cítrico, 5- ácido sucínico.

Pela observação da figura 3.1 verifica-se que existem ácidos orgânicos comuns nas uvas e nos vinhos, como é o caso do ácido tartárico (1) e málico (2). O ácido láctico (3) e o ácido sucínico (5) apenas se encontram presente nos vinhos pois resultam dos processos fermentativos. Contudo o ácido sucínico apenas foi detetado num dos vinhos tintos produzidos com a casta Negra Mole, Morgado do Quintão Tinto. Também foi identificada a presença de ácido cítrico (4) nas uvas e nos vinhos.

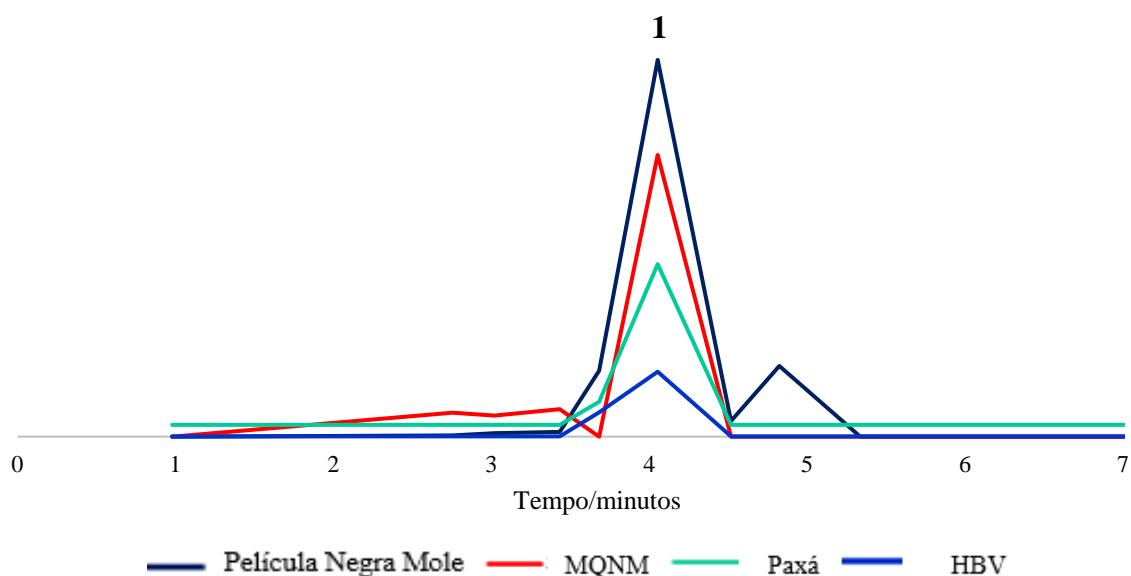


Figura 3.2- Antocianinas presentes na película das uvas Negra Mole e nos vinhos produzidos a partir desta (HPLC). 1- Malvidina-3-O-glicósido.

Como mostra a figura 3.2 verifica-se que existe, pelo menos, uma antocianina (1) presente nos vinhos rosé e tinto, assim como na película das uvas da casta Negra Mole. Optou-se por comparar a película das uvas com os vinhos, uma vez que é nas películas que se encontra maior parte das antocianinas. Desta forma, e como o padrão otimizado no HPLC foi da Malvidina-3-O-glicósido, é possível afirmar que esta antocianina é comum nas películas das uvas e nos vinhos estudados. A maior quantidade desta antocianina foi encontrada nas películas das uvas da casta Negra Mole, seguidamente, no vinho Morgado do Quintão Negra Mole (tinto), Paxá (Tinto) e Herdade do Barranco do Vale (Rosé).

3.4 Quantificação de ácidos orgânicos nas uvas e vinhos algarvios

A quantificação de ácidos orgânicos nas uvas e nos vinhos foi determinada a partir das retas de calibração e pelas áreas dos picos de cada ácido obtido pela análise em HPLC das amostras injetadas. A quantidade de ácidos orgânicos presentes nas uvas das castas autóctones e estrangeiras produzidas no Algarve encontra-se descrita na tabela 3.3 e a quantidade destes ácidos presente nos vinhos algarvios encontra-se descrito na tabela 3.5. Foi ainda determinada a quantidade de ácidos orgânicos nas películas, grainhas e polpa das uvas da casta tinta Negra Mole e Syrah. Os resultados encontram-se na tabela 3.4.

Tabela 3.3 - Teores de ácidos orgânicos encontrados nas uvas das castas autóctones e na casta Syrah (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Castas autóctones e estrangeiras produzidas no Algarve			
	Crato Branco	Negra Mole	Syrah
Ácidos orgânicos (mg/kg de matéria seca)			
Ácido tartárico	378,1 ^a \pm 0,8	387,9 ^a \pm 0,6	785,1 ^b \pm 0,8
Ácido málico	141,2 ^a \pm 0,2	57,80 ^b \pm 0,1	83,5 ^y \pm 0,4
Ácido chiquímico	0,492 ^a \pm 0,001	0,717 ^b \pm 0,001	0,796 ^b \pm 0,003
Ácido cítrico	nd	0,0944 \pm 0,0002	nd

nd – abaixo do limite de deteção. Em cada linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

Os resultados indicam que as uvas da casta tinta Syrah apresentaram maior teor de ácidos orgânicos (869,9 mg/kg matéria seca), seguindo-se as uvas Crato Branco (520,1 mg/kg matéria seca) e as uvas Negra Mole (446,7 mg/kg matéria seca). Por falta de referências na literatura acerca das castas Crato Branco e Negra Mole determinou-se o teor de ácidos orgânicos nas uvas Syrah produzida no Algarve para comparar a concentração destes nas uvas.

A natureza e concentração de ácidos orgânicos são importantes para as características organoléticas das uvas. O ácido tartárico foi o composto mais abundante nas uvas, principalmente nas uvas tintas Syrah (785,1 \pm 0,8 mg/kg de matéria seca). O ácido málico foi outro dos ácidos que se encontram em maior quantidade, estando presente de uma forma mais acentuada na casta Crato Branco (141,2 \pm 0,2 mg/kg matéria seca). O ácido tartárico e málico são os ácidos orgânicos mais abundantes nas uvas e nos vinhos, sendo que os seus teores se encontram relacionados com a estabilidade química e biológica dos vinhos (Curvelo-Garcia & Barros, 2015). A sua quantidade nas uvas é geralmente utilizada para determinar a data de colheita, uma vez que o seu comportamento durante a maturação das uvas é diferente (Silva & Queiroz, 2016). O ácido chiquímico encontra-se em quantidades muito reduzidas nas uvas e o ácido cítrico apenas foi detetado nas uvas da casta Negra Mole. Este ácido é encontrado em pequenas quantidades nas uvas maduras e desaparece durante os processos fermentativos sendo que a sua presença nos vinhos é quase nula.

Tabela 3.4 - Teor de ácidos orgânicos presentes nas uvas das castas tintas Negra Mole e Syrah (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

	Ácidos orgânicos (mg/g de matéria seca)		
	Grainha	Película	Polpa
Negra Mole			
Ácido tartárico	0,15 ^a \pm 0,02	0,08 ^b \pm 0,01	0,39 ^y \pm 0,05
Ácido málico	0,027 ^a \pm 0,001	0,105 ^b \pm 0,001	0,053 ^a \pm 0,001
Ácido chiquímico	nd	nd	nd
Ácido cítrico	nd	nd	nd
Syrah			
Ácido tartárico	0,07 ^a \pm 0,01	0,14 ^b \pm 0,01	0,09 ^a \pm 0,01
Ácido málico	0,030 ^a \pm 0,001	0,05 ^a \pm 0,001	0,046 ^b \pm 0,005
Ácido chiquímico	nd	0,0008 \pm 0,0001	nd
Ácido cítrico	nd	nd	nd

nd-abaixo do limite de deteção. Em cada linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

A tabela 3.4 mostra a quantidade média de ácidos orgânicos presentes nas diferentes partes das uvas tintas Negra Mole e Syrah produzidas na região. Pela observação dos resultados constata-se que o ácido tartárico é o que se encontra em maior quantidade em todas as partes das uvas estudadas. No entanto, é na grainha ($0,15 \pm 0,02$ mg/g matéria seca) e polpa ($0,39 \pm 0,05$ mg/g matéria seca) da casta Negra Mole que este ácido se encontra em maioria. O ácido málico encontra-se em maiores quantidades na película e na polpa das uvas de ambas as castas tintas. Um estudo realizado para determinação de ácidos orgânicos nas uvas tintas e brancas produzidas na região do Douro revelam que as quantidades presentes nas diferentes partes das uvas são superiores às encontradas nas uvas produzidas no Algarve. O mesmo estudo menciona que a maior quantidade de ácido tartárico e málico se encontra presente na polpa e nas películas, e, portanto, os resultados obtidos estão em conformidade com os reportados (Mota *et al.*, 2018). A quantidade de ácido chiquímico é baixa como seria de esperar, assim como a quantidade de ácido cítrico que não foi detetada.

Tabela 3.5 - Teores de ácidos orgânicos presentes em vinhos da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

	Vinhos algarvios				
	MQCB	QP	HBV	MQNM	Paxá
Ác. orgânicos (g/L)					
Ác. tartárico	2,1 ^a \pm 0,8	1,7 ^a \pm 0,4	6,13 ^b \pm 0,1	2,4 ⁰ \pm 1,4	1,4 ^γ \pm 0,0
Ác. málico	1,8 ^a \pm 0,5	1,8 ^a \pm 0,5	1,6 ^b \pm 0,3	1,9 ^a \pm 1,4	2,9 ^γ \pm 0,2
Ác. láctico	0,02 ^a \pm 0,01	0,03 ^a \pm 0,01	0,03 ^a \pm 0,01	0,04 ^b \pm 0,03	0,05 ^b \pm 0,01
Ác. chiquímico	0,001 ^a \pm 0,002	nd	nd	0,012 ^b \pm 0,001	0,013 ^b \pm 0,001
Ác. cítrico	0,0006 ^a \pm 0,0004	nd	nd	0,0007 ^a \pm 0,0004	nd
Ác. succínico	nd	nd	nd	0,001 \pm 0,0002	nd

nd-abaixo do limite de deteção. Em cada linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Pela análise dos resultados descritos na tabela 3.5 verifica-se que, de forma geral, a concentração de ácidos orgânicos nos vinhos tintos da casta Negra Mole é superior aquela encontrada nos vinhos brancos de Crato Branco sendo que o ácido tartárico é aquele que se encontra em maior quantidade. Os valores quantificados deste ácido encontram-se de acordo com valores já publicados para vinhos tintos e brancos (0,95-6,50 g/L) (Coelho *et al.*, 2018). O ácido láctico não foi detetado nas uvas, uma vez que resulta dos processos fermentativos e, portanto, só se encontra nos vinhos. Nas amostras de vinhos tinto encontrou-se em maior quantidade no vinho Paxá (0,05 \pm 0,01 g/L).

A concentração de ácido chiquímico e cítrico encontra-se em quantidades relativamente pequenas nos vinhos sendo que em alguns casos não se atingiu o limite de deteção. O ácido cítrico detetado em todos os vinhos é menor que 1 g/L, encontrando-se de acordo com a legislação. Este ácido pode ser adicionado ao vinho para corrigir a acidez, o que exige o seu controlo. O ácido succínico resulta da atividade metabólica das leveduras durante a fermentação. Segundo De Klerk (2010), os vinhos tintos demasiado ácidos apresentam concentrações de ácido succínico que variam entre 0,5-1,5 g/L. A concentração demasiado elevada deste ácido indica que ocorreu algum problema durante a fermentação alcoólica e tal como o ácido cítrico deve ser um parâmetro a ter em atenção. Nos vinhos estudados verifica-se que os teores de ácido succínico são baixos (<0,001 g/L) levando a aceitar que não ocorreu nenhum problema durante a fermentação dos vinhos.

3.5 Quantificação de compostos fenólicos nas uvas e vinhos algarvios

Os compostos fenólicos foram determinados por HPLC num comprimento de onda de 280 nm. Estes contribuem para a qualidade organolética dos vinhos. O perfil e a composição de determinados polifenóis tem sido utilizados como ferramenta para certificação (Cosme *et al.*, 2021). Os resultados da quantificação dos compostos fenólicos nas uvas e nos vinhos encontra-se descrito na tabela 3.6 e 3.7.

Tabela 3.6 - Teor de compostos fenólicos nas uvas das castas autóctones da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Compostos fenólicos (mg/g matéria seca)	Castas autóctones do Algarve	
	Uvas Crato Branco	Uvas Negra Mole
Catequina	15,5 ^a \pm 3,0	15,6 ^a \pm 3,6
Ácido vanílico	nd	nd
Ácido gálico	nd	nd
Ácido cafeico	nd	1,61 \pm 0,01

nd - abaixo do limite de deteção. Em cada linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

Os compostos fenólicos encontram-se em diferentes quantidades nas uvas. Verificou-se a presença de catequina nas uvas das duas castas autóctones, sendo que a sua quantidade é muito semelhante em ambas as castas. Também foi detetada a presença de ácido cafeico nas uvas da casta Negra Mole (média de 1,61 \pm 0,01 mg/g matéria seca). Os restantes compostos fenólicos ficam abaixo do limite de deteção. O teor de catequina encontrado na uva tinta autóctone do Algarve é superior ao encontrado nas uvas tintas produzidas na região do Douro (0,56 - 2,50 mg/g resíduo). Já o teor de ácido cafeico encontrado nas uvas tintas autóctones do Algarve também é superior ao encontrado nas uvas tintas da região do Douro (0,52 - 0,76 mg/g resíduo) (Tournour *et al.*, 2015).

Em relação às uvas Crato Branco, o teor de catequina detetado é muito inferior ao encontrado noutras castas brancas em Portugal, como por exemplo a casta Moscatel (59,43 mg/g matéria seca) e a casta Malvasia Fina (106,42 mg/g matéria seca) (Leal *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos são encontrados, principalmente nas películas e nas grainhas, enquanto na polpa, a concentração destes é muito baixa. Curiosamente, apenas foi detetada catequina na polpa da casta Negra Mole (13,5 \pm 0,1 mg/g matéria seca). Podem existir mais compostos fenólicos nas diferentes partes das uvas, mas as quantidades são demasiado baixas

para serem detetadas. Importante será mencionar que a quantidade destes compostos nas uvas e conseqüentemente, nos vinhos depende da própria casta e de fatores ambientais (Merkytė *et al.*, 2020).

Tabela 3.7 - Teor de compostos fenólicos presentes nos vinhos da região do Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

	Vinhos algarvios				
	MQCB	QP	HBV	MQNM	Paxá
Compostos fenólicos (mg/L)					
Catequina	194,01 ^a \pm 0,01	328,94 ^b \pm 0,02	147,02 ^γ \pm 0,05	157,09 ^a \pm 0,01	41,52 ^γ \pm 0,01
Ác. vanílico	nd	nd	2,3842 \pm 0,0002	nd	nd
Ác. gálico	nd	nd	40,64 ^a \pm 0,003	66,773 ^b \pm 0,002	nd
Ac. cafeico	9,56 ^a \pm 0,00	26,31 ^b \pm 0,01	nd	39,45 ^γ \pm 0,01	nd

nd -abaixo do limite de deteção. Em cada linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

Pela observação da tabela 3.7 é possível verificar que a catequina se encontra presente em todos os vinhos monocasta algarvios estudados. A catequina apresenta valores de concentração médio que variam entre 41,52 e 328,9 mg/L sendo que a maior quantidade deste composto fenólico se encontra no vinho tinto Morgado do Quintão Negra Mole.

O ácido vanílico foi detetado em concentrações muito baixas e apenas num dos vinhos em estudo. O ácido gálico foi detetado em dois vinhos, sendo que ambos são tintos. Um estudo desenvolvido por Visioli *et al.*, (2020) referente à quantidade dos diferentes compostos fenólicos em vinhos menciona concentrações de 0,0 a 3,2 mg/L de ácido vanílico para vinhos tintos e de 0,1 a 1,2 mg/L para vinhos brancos. O mesmo estudo menciona valores de ácido gálico de 0,0 a 126 mg/L em vinhos tintos e de 0,0 a 11 mg/L em vinhos brancos, e valores de ácido cafeico de 0,0 a 77 mg/L em tintos e de 0,0 a 7 mg/L em brancos. Comparando os valores obtidos no estudo acima mencionado e os valores obtidos nos vinhos do Algarve verifica-se que se encontram de acordo, com exceção do teor de ácido cafeico nos vinhos brancos algarvios que é superior. Os compostos fenólicos são muito importantes nos vinhos brancos porque se encontram na película das uvas. No entanto, estes compostos encontram-se em concentrações muito baixas e talvez por isso não tenham sido todos detetados.

3.6 Quantificação de antocianinas em uvas, películas e vinhos do Algarve

As antocianinas são dos principais pigmentos responsáveis pela cor nos vinhos tintos e rosés. Estes pigmentos encontram-se localizados nas películas das uvas sendo que a antocianina mais abundante nas uvas é a Malvidina-3-O-glicósido. A quantidade de antocianinas varia de acordo com a localização geográfica, genótipo, tipo de técnicas de cultivo aplicadas, intensidade e tempo da maceração (Simonetti, 2018).

A análise individualizada das antocianinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência obtido a 520 nm, utilizando como padrão a Malvidina-3-O-glicósido por ser a mais comum nas uvas tintas. Neste trabalho, foi determinada a quantidade deste composto presente em películas e em uvas da casta tinta Negra Mole produzida na região do Algarve. Os resultados da quantificação nas uvas e nos vinhos são apresentados na tabela 3.8 e 3.9, respetivamente.

Tabela 3.8 - Teor de antocianinas presente nas películas e no macerado de uvas inteiras da casta Negra Mole produzidas no Algarve (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Amostras	Película (mg/g de película seca)	Uvas (mg/g matéria seca)
Negra Mole	0,070 ^a \pm 0,001	0,030 ^b \pm 0,005

Na linha, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Pela observação dos resultados expressos na tabela 3.8 verifica-se que é nas películas que se encontra maior quantidade de antocianinas. O teor de antocianinas nas películas da casta Negra Mole é superior ao teor de antocianinas encontrado nas uvas (0,02-0,03 mg/g matéria), uma vez que é nas películas que se concentram grande parte deste pigmento. Foram verificadas diferenças significativas na quantidade de antocianinas nas películas e uvas da casta Negra Mole ($p < 0,05$). Para comparação foi determinado o teor de antocianinas nas uvas Syrah produzidas no Algarve (0,120 \pm 0,001 mg/g matéria seca) e verificaram-se que estas apresentaram maior teor de antocianinas do que as presentes na casta Negra Mole. Sabe-se, ainda, que a quantidade de antocianinas presente nas películas das uvas Castelão do Algarve rondam os 0,06-1,1 mg/g de película seca, teores ligeiramente superiores aos encontrados nas películas das uvas Negra Mole do Algarve (Galego & Da Silva, 2020). Tal facto é esperado uma vez que as castas Syrah e Castelão apresentam bagos completamente escuros e a casta Negra Mole apresenta bagos com diferentes colorações.

Tabela 3.9 - Teor de antocianinas presente em diferentes vinhos do Algarve monocasta tinta Negra Mole (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Amostras	Tipo de Vinho	Antocianinas (mg/L)
HBV	Vinho tranquilo (Rosé)	110,5 ^a \pm 0,1
MQNM	Vinho tranquilo (Tinto)	420,6 ^b \pm 0,1
Paxá	Vinho tranquilo (Tinto)	277,1 ^y \pm 0,3

Na mesma coluna, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

O teor de antocianinas, expresso em Malvidina-3-O-glicósido, no vinho rosé feito com a casta Negra Mole do Algarve é inferior ao encontrado em vinhos tintos preparados com a mesma casta (tabela 3.9). O teor de antocianinas presentes no vinho rosé HBV é inferior ao encontrado nos outros dois vinhos tinto. Não existem dados sobre as antocianinas presentes em vinhos rosés e tintos reportados para a casta Negra Mole do Algarve. No entanto, segundo um estudo realizado por Galego & Da Silva (2020) o teor de antocianinas presentes em vinhos rosé preparados com a casta Castelão do Algarve variou entre 1,4 - 12,7 mg/L, valor inferior ao detetado no vinho rosé Negra Mole (média de 110 mg/L). Como já mencionado, os teores de antocianinas nas uvas e nos vinhos são altamente variáveis dependendo de diversos fatores incluindo a casta, estado de maturação e a própria tecnologia de produção. Para além disto, os vinhos rosé podem ser preparados com diferentes procedimentos. Podem ter tempos de maceração de 1 ou mais horas, ou podem ser macerados em minutos, podem também ser preparados por mistura.

3.7 Quantificação do resveratrol

Nas uvas, a síntese primária de resveratrol dá-se nas películas sendo que a concentração deste composto é baixa ou quase inexistente na polpa. A diferença na quantidade de resveratrol nos vinhos resulta do processo fermentativo. Na vinificação dos vinhos tintos, a película está em contacto com o mosto existindo maior concentração de resveratrol em vinhos tintos (Gerogiannaki-Christopoulou *et al.*, 2006). Na tabela 3.10 encontram-se os resultados obtidos para a quantificação de resveratrol nas películas, grainhas e polpa da casta Negra Mole e nos vinhos tintos e brancos algarvios.

Tabela 3.10 - Teor de resveratrol encontrado em diferentes partes das uvas da casta autóctone Negra Mole e em vinhos algarvios (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Produto	Unidade	Trans-Resveratrol
Película Negra Mole	$\mu\text{g/g}$ extrato seco	$3,54 \pm 0,01$
Grainha Negra Mole	$\mu\text{g/g}$ extrato seco	$1,69 \pm 0,01$
Polpa Negra Mole	$\mu\text{g/g}$ extrato seco	$0,76 \pm 0,01$
Vinho Tinto Herdade Barranco do Vale 2019	mg/L	$5,801 \pm 0,004$
Vinho Tinto Morgado do Quintão Negra Mole 2020	mg/L	$4,409 \pm 0,001$
Vinho Tinto Paxá Negra Mole 2019	mg/L	$5,389 \pm 0,004$
Vinho Branco Morgado do Quintão Crato Branco 2018	mg/L	$6,97 \pm 0,01$
Vinho Branco Quinta da Penina 2021	mg/L	$9,94 \pm 0,01$

Os teores de resveratrol encontrados nas películas das uvas da casta Negra Mole são inferiores aos encontrados nas películas de outras castas produzidas no Algarve, como por exemplo na casta Syrah e Castelão ($8,6 \mu\text{g/g}$ de casca seca e $19,8 \mu\text{g/g}$ de casca seca, respetivamente) (Galego & Da Silva, 2020).

De acordo com os valores reportados em Paulo *et al.*, (2011), a quantidade de *trans*-resveratrol encontrado nos vinhos tintos portugueses varia de $0,05 - 10,9 \text{ mg/L}$ e portanto os valores obtidos para os vinhos tintos do Algarve encontram-se de acordo com o que já se encontra publicado. No caso dos vinhos estudados é o Quinta da Penina que apresenta o teor mais elevado em resveratrol, sendo que seria de esperar maiores teores de resveratrol nos vinhos tintos. De forma geral, a quantidade de resveratrol é superior nos vinhos tintos, mas as concentrações podem variar de acordo com a origem e tipo de uvas, processo de vinificação e até infeção fúngica das vinhas (Concenço *et al.*, 2019). É possível que existam menos infeções fúngicas no Algarve por ter pouca humidade e muitas horas de sol. Estudos realizados em 4 vinhos tintos do Algarve indicaram teores em *trans*-resveratrol variando entre $0,13$ e $6,1 \text{ mg/L}$ e, portanto, os resultados encontram-se de acordo com os teores já encontrados em vinhos algarvios (Galego, 2015).

3.8 Diferenças entre compostos das duas castas algarvias por LC-MS

A técnica de HPLC permitiu quantificar os principais compostos presentes nas uvas e nos vinhos. Com o intuito de conhecer mais compostos presentes nas uvas autóctones da região do Algarve, que não foram possíveis quantificar por HPLC, foram realizadas análises por LC-MS. As amostras foram analisadas em modo de ionização positiva e negativa, e os compostos identificados a partir dos dados do *compound discoverer* encontram-se nas tabelas 3.11 e 3.12. Os compostos identificados pela *mzCloud* apresentam uma semelhança igual ou superior a 85%.

Tabela 3.11 - Compostos identificados na casta Negra Mole pelo LC-MS

Tempo de retenção	Nome	Fórmula	m/z (+/-)	mzCloud "match"
0.887	Ácido Treónico (L-Threonic acid)	C ₄ H ₈ O ₅	135.03071 (-)	94.9
1.056	Ácido Furóico (2-Furoic acid)	C ₅ H ₄ O ₃	111.00925 (-)	94.1
1.072	Ácido Glucónico (Galactonic acid)	C ₆ H ₁₂ O ₇	195.05130 (-)	99.6
7.909	Triptofano (Tryptophan)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.08373 (-)	99.5
11.092	Isoquercetina (Quercetin-3β-D-glucoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08947 (-)	88.6
30.137	Ácido Ursólico (Ursolic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.35461 (-)	90.5
14.030	Astilbin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.11002 (-)	87.5
10.927	Ácido Isoferúlico (Isoferulic acid)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177.05368 (+)	99.5
11.455	Cianidina (Kuromanin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.10457 (+)	95.6
31.954	Ácido Oleico (Oleic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.26190 (+)	92.5

Pela observação da tabela 3.11 é possível verificar que foram vários os compostos identificados pelo modo de ionização negativo. O primeiro composto identificado foi o ácido treónico, um metabolito do ácido ascórbico (vitamina C) utilizado pelas plantas contra o stress oxidativo resultante das altas/baixas temperaturas ou ataques de patógenos das videiras (Dalicuba *et al.*, 2021). Foi identificado ácido glucónico, um derivado da glicose, associado à espécie da *Botrytis cinerea* (Fardelone *et al.*, 2021). A presença deste composto pode indicar que as uvas Negra Mole tinham sofrido contaminação com este patógeno e consequentemente afetar as características organolépticas do vinho com elas produzidas. De entre os compostos presentes nas uvas Negra Mole foi identificada a isoquercetina, um flavonoide importante no desenvolvimento da coloração do vinho, uma vez que atua como co-pigmento das antocianinas (Gramza-Michałowska *et al.*, 2019). Também foi identificada nas uvas Negra Mole uma antocianina, a cianidina.

Tabela 3.12 - Compostos identificados na casta Crato Branco por LC-MS

Tempo de retenção	Nome	Fórmula	m/z (+/-)	mzCloud “match”
0.849	Glutamina (D-(-)-Glutamine)	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	145.06261 (-)	98.7
0.889	Ácido Glutâmico (L-Glutamic acid)	C ₅ H ₉ NO ₄	146.04695 (-)	94.4
14.184	Isoquercetina (Quercetin-3β – D-glucoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.09005 (-)	98.8
13.921	Rutina (Rutin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	611.15894 (+)	99.7
14.510	Reynoutrina (Reynoutrin)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435.09000 (+)	98.0
15.576	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05352 (+)	96.0

Também pela técnica de LC-MS foi possível identificar os compostos presentes nas uvas Crato Branco. Segundo a tabela 3.12 verifica-se a presença de Kaempferol, um flavonóide que varia da cor branca ao amarelo contribuindo diretamente para a cor e o poder antioxidante nos vinhos brancos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2010). Ainda outro composto detectado e importante pelo seu contributo para a saúde foi a rutina que apresenta elevado poder antioxidante e ajuda no combate a células cancerígenas (Damin *et al.*, 2019).

De forma geral, os principais ácidos orgânicos e compostos fenólicos encontram-se presentes em ambas as castas algarvias em quantidades muito semelhantes, à exceção do ácido málico que se encontra duas vezes mais na casta Crato Branco do que na casta Negra Mole (tabela 3.3). Pelas análises realizadas por LC-MS descritas nas tabelas 3.11 e 3.12 verifica-se que, na maioria, os compostos identificados na casta Negra Mole não são os mesmos identificados na casta Crato Branco. A isoquercetina é um composto comum às duas castas. Contudo, existem compostos que apenas serão encontrados na casta Negra Mole como é o caso da cianidina.

3.9 Identificação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos vinhos por LC-MS

A análise das diferentes amostras de vinho foi preparada de forma a obter o máximo de informação possível. Cada amostra foi analisada, em modo de ionização positivo e negativo. A técnica de LC-MS permitiu identificar outros compostos presentes no vinho e confirmar a presença dos ácidos orgânicos e compostos fenólicos identificados por HPLC.

A presença do ácido málico no vinho QP e do ácido tartárico no Vinho MQNM foram dois dos ácidos confirmados por LC-MS. Também a presença do ácido succínico e do composto fenólico, catequina, no vinho tinto MQNM foi confirmado pela técnica de LC-MS (modo negativo) (figura 3.3). Para além da confirmação destes, foi possível identificar outros compostos presentes nos vinhos algarvios, como por exemplo o ácido salicílico (figura 3.4), a quercetina, ambos com propriedades antioxidantes, e o ácido gentísico (ácido benzóico) utilizado como conservante alimentar. Foi identificado o ácido ferúlico e o ácido fumárico, geralmente utilizado para inibir a fermentação maloláctica ou evitar a transformação do ácido málico e manter a frescura do vinho em zonas quentes e o ácido cumárico, um dos ácidos cinâmicos mais importantes (DuBois *et al.*, 2021). Como já mencionado a identificação teve como base os traços de LC-MS, os padrões de fragmentação, sendo atribuídos sinais m/z aos diferentes compostos segundo o peso molecular (MW) dos fragmentos obtidos (tabela 3.13).

Tabela 3.13 - Caracterização dos compostos fenólicos encontrados nos vinhos por LC-MS em modo negativo, nomeadamente, tempo de retenção (R_t), peso molecular (MW) e padrão de fragmentação (m/z).

Nº	R_t (min)	Compostos	MW	Maior fragmento (m/z)
1	1.005	Ácido fumárico	132	71 (100)
2	13.92	Ácido salicílico	138	90, 93, 126
3	5.945	Ácido gentísico	154	109 (100)
4	12.552	Ácido cumárico	164	119 (100)
5	10.607	Ácido ferúlico	194	134, 165, 178
6	17.800	Quercetina	302	151, 179, 193, 229

Negrito corresponde ao pico base (100%)

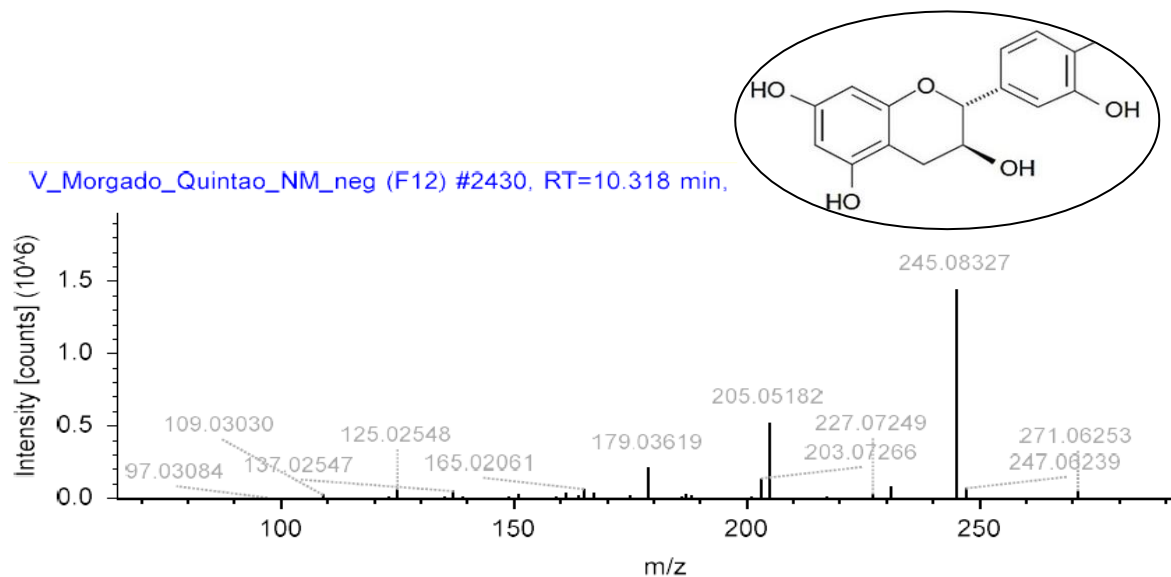


Figura 3.3 – Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 0-300) e respectivos fragmentos para identificação da catequina obtido por LC-MS (modo negativo).

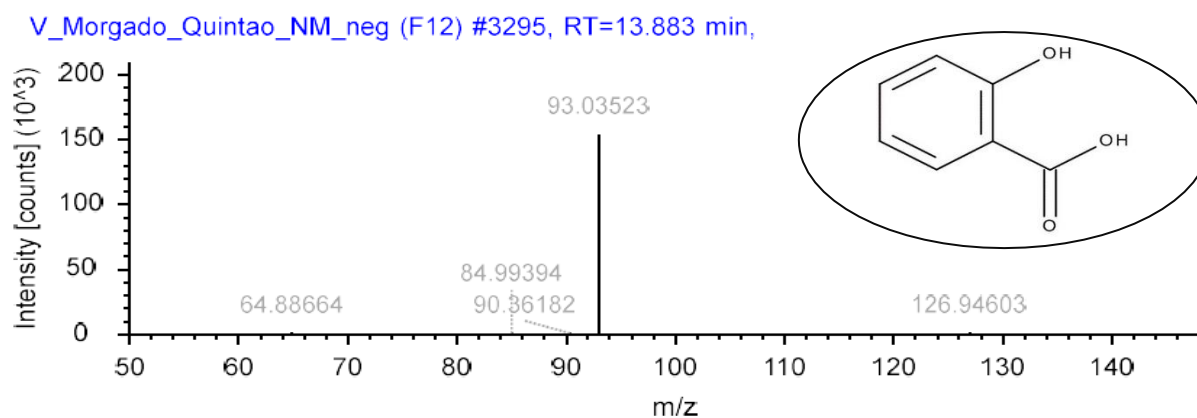


Figura 3.4 – Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 50-150) e respectivos fragmentos para identificação do ácido salicílico obtidos por LC-MS (modo negativo).

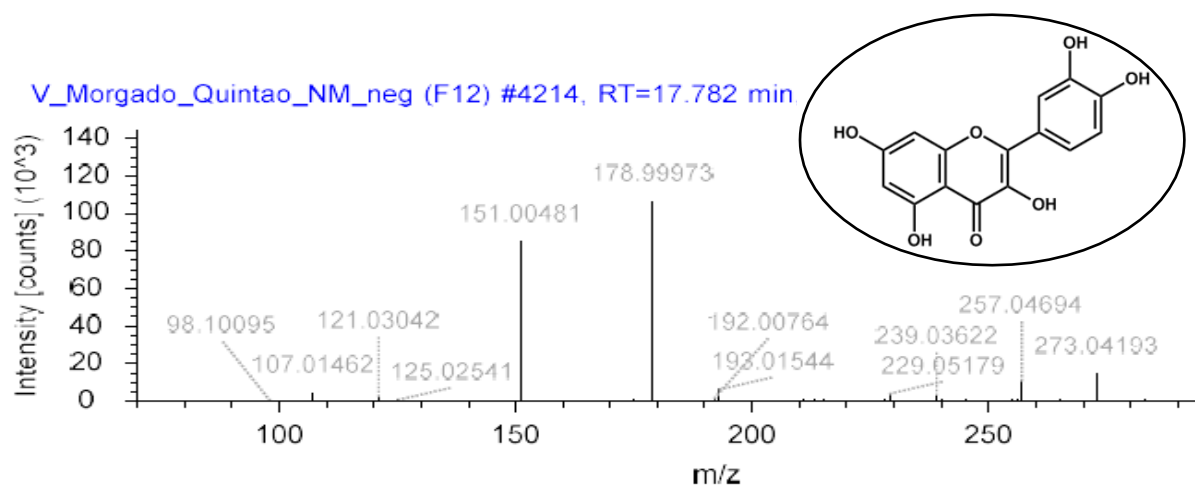


Figura 3.5 - Espectro de massa para o vinho MQNM (m/z 0-300) e respectivos fragmentos para identificação da Quercetina obtido por LC-MS (modo negativo).

3.10 Caracterização do perfil de antocianinas da Casta Negra Mole por LC-MS

O perfil das antocianinas das películas de uva da casta Negra Mole, vinhos tintos e rosé do Algarve desta mesma casta foi estudado por HPLC com detecção a 520 nm. As antocianinas mais abundantes nas películas e nos vinhos são a malvidina-3-O-glicosido. A análise posterior por LC-MS (modo positivo) permitiu confirmar a identificação das antocianinas mais abundantes. Com base nos traços de LC-MS e nos padrões de fragmentação, foram verificados sinais $m/z = 493, 535$ e 639 que correspondem à malvidina-3-O-glicósido, malvidina-3-O-acetilglicósido e malvidina-3-O-coumaroilglicósido, respetivamente (Tabela 3.14).

Tabela 3.14 - Ião típico e padrão de fragmentação das diferentes antocianinas identificadas nas películas das uvas Negra Mole e nos vinhos produzidos com esta casta.

Nº	Antocianina	M ⁺	Fragmento e abundância (%)
1	Malvidina-3-O-glicósido	493	MS ² [493]: 331 (100)
2	Malvidina-3-O-acetilglicósido	535	MS ² [535]: 331 (100)
3	Malvidina-3-O-coumaroilglicósido	639	MS ² [639]: 331 (100)

Como já mencionado a natureza das antocianinas detetadas por HPLC foram confirmadas por espectrometria de massa (LC-MS). A Figuras 3.6 corresponde aos espectros de massa obtido por LC-MS para identificar antocianinas nas uvas e nos vinhos Negra Mole.

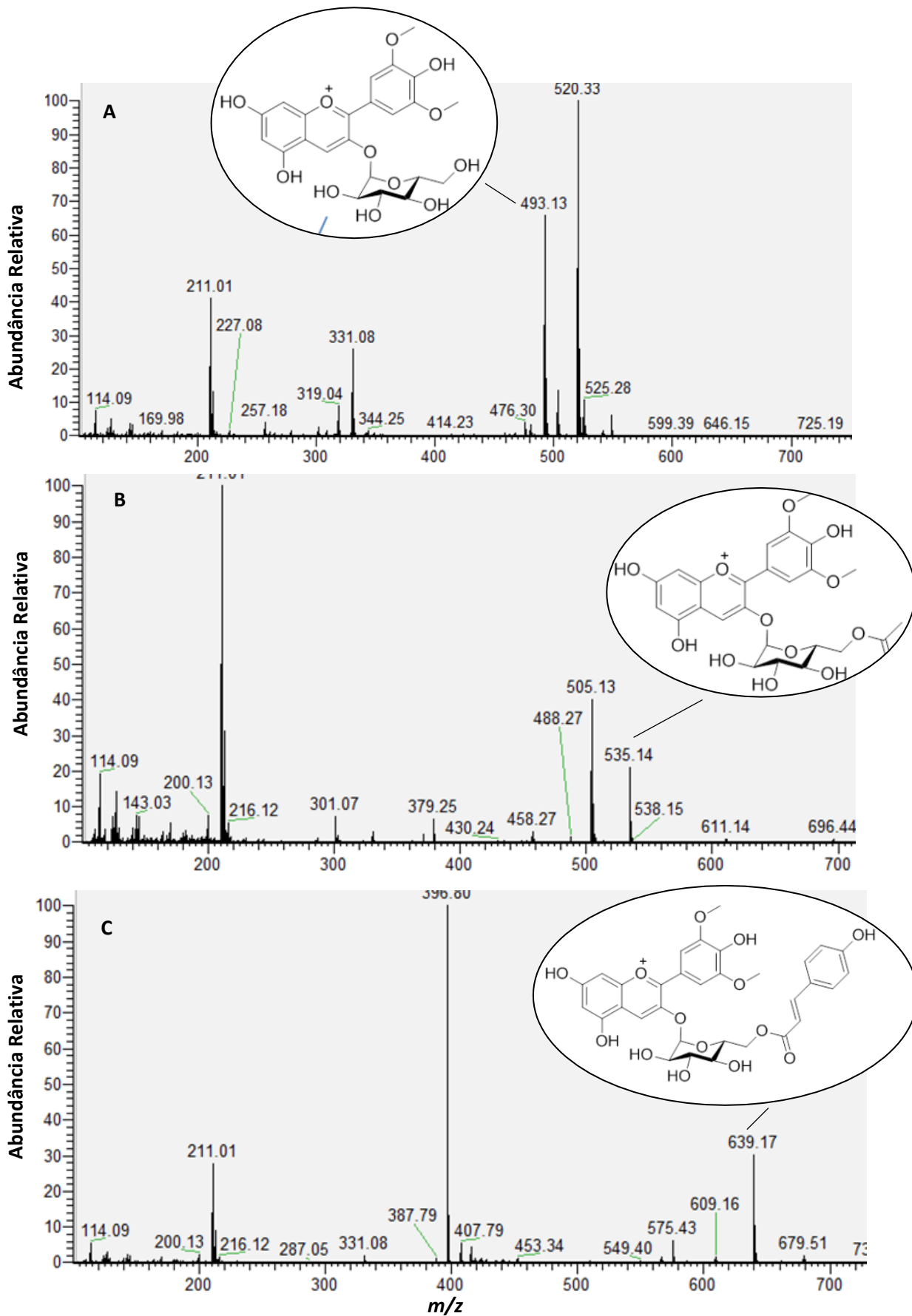


Figura 3.6 - Espectro de massa obtido para as antocianinas por LC-MS: (A)- Malvidina-3-O-glicósido identificada num vinho tinto; (B)- Malvidina-3-O-acetilglicósido e (C)- Malvidina-3-O-coumaroilglicósido identificada nas películas das uvas.

3.11 Determinação da Atividade antioxidante dos vinhos algarvios

A atividade antioxidante foi determinada nos cinco vinhos do Algarve através de duas reações específicas que permitem testar a capacidade antioxidante, nomeadamente, método ABTS e o método dos fenóis totais. Os resultados encontram-se expressos na tabela 3.15.

Tabela 3.15 - Propriedades antioxidantes dos vinhos algarvios analisados e as respetivas castas autóctones (média \pm desvio padrão) ($n=3$).

Amostras Vinho	Castas	%ABTS (inibição)	FT (mg/L) ^b
HBV (Rosé)	Negra Mole	68,57 ^a \pm 0,03	44871 ^a \pm 0,001
Paxá (Tinto)	Negra Mole	69,59 ^a \pm 0,01	48500 ^a \pm 0,001
MQNM (Tinto) ^a	Negra Mole	78,91 ^b \pm 0,01	72596 ^b \pm 0,001
MQCB (Branco)	Crato Branco	29,60 ^γ \pm 0,01	23028 ^γ \pm 0,002
QP (Branco)	Crato Branco	57,05 ^θ \pm 0,01	34550 ^θ \pm 0,003

Na mesma coluna, o mesmo símbolo significa a não existência de diferenças significativas com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

^a amostras diluídas 1:5

^b valores expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) l⁻¹

Segundo os resultados apresentados na tabela 3.15 verifica-se que o poder antioxidante varia consoante o método aplicado. De forma geral, os vinhos rosé e tinto apresentam maiores quantidades de fenóis totais que corresponde a maior poder antioxidante. O vinho tinto Morgado do Quintão foi o que apresentou maior quantidade de fenóis totais (72596 \pm 0,001 mg/L). A concentração de fenóis totais presentes nos vinhos apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). O teor de fenóis totais em vinhos algarvios produzidos com a casta Negra Mole é superior ao encontrado nos vinhos da região da Madeira produzidos com a casta Tinta Negra (1827 mg/L). O vinho rosé produzido a partir da casta Negra Mole do Algarve também apresenta maior teor de fenóis totais que os vinhos rosé produzidos com a casta Tinta Negra da Madeira (665 mg/L) (Paixão *et al.*, 2007).

Pelo método ABTS é possível verificar que são os vinhos tintos que apresentam maior percentagem de inibição (média de 73,92%) seguindo-se o vinho rosé (68,57%) e os vinhos brancos algarvios (média 43,34%). Verificaram-se diferenças significativas entre o vinho tinto MQT e os vinhos tintos P ($p < 0,05$). Também se verificaram diferenças significativas entre os dois tipos de vinho branco sendo que é o Vinho branco Quinta da Penina que apresenta maior poder antioxidante. A percentagem de inibição determinada para vinhos rosé produzidos com a casta Negra Mole do Algarve é superior ao encontrado no vinho rosé da Madeira produzido com a casta Tinta Negra (57% ABTS) (Paixão *et al.*, 2007).

4. Conclusão

A realização deste trabalho permitiu otimizar e validar métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor UV-Vis, com modo de eluição isocrático, para determinação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos em vinhos e uvas de duas castas algarvias, Negra Mole e Crato Branco. Com a alteração da fase móvel e comprimento de onda foi possível otimizar e adaptar métodos, já usados em sistemas onde é possível usar gradientes com vários eluentes em simultâneo, ao contrário do que acontece nos sistemas isocráticos, onde apenas é possível usar um único eluente. Em paralelo, foi utilizado o LC-MS para identificação de diferentes compostos presentes nas uvas e nos vinhos.

Na casta Negra Mole verificou-se que a quantidade de ácido tartárico, chiquímico e cítrico é mais elevada que na casta branca Crato Branco. Contudo é a casta branca que apresenta maior quantidade de ácido málico. Também se constatou que é na polpa da uva Negra Mole que se encontra maior quantidade de ácido tartárico e na película que se encontra maior quantidade de ácido málico. O ácido tartárico e málico são os ácidos orgânicos mais abundantes nas uvas sendo utilizados muitas vezes para determinar a data de colheita, uma vez que o seu comportamento oscila durante a maturação das uvas. Relativamente à composição fenólica das uvas das castas autóctones foi determinado que é a catequina que mais predomina nas uvas sendo que também foi detetado e quantificado o ácido cafeico presente nas uvas Negra Mole. A maior quantidade de resveratrol foi, curiosamente, verificada na película das uvas Negra Mole. Nos vinhos algarvios verificou-se a presença de ácido tartárico, málico e láctico. Também foi determinado ácido chiquímico e cítrico em alguns dos vinhos, mas em concentrações relativamente baixas. A catequina foi o único composto fenólico quantificado em todos os vinhos estudados. Foi o vinho Morgado do Quintão Negra Mole que apresentou maior teor de antocianinas e o vinho branco Quinta da Penina que apresentou maior teor de resveratrol. Pelo método de LC-MS foi possível identificar as antocianinas predominantes na casta autóctone Negra Mole e verificou-se que prevalecem a Malvidina-3-O-glicósido, Malvidina-3-O-acetilglicósido e Malvidina-3-O-coumaroilglicósido.

Ainda pela técnica de LC-MS foi possível identificar a presença de ácido fumárico, genticónico, cumárico, ferúlico, salicílico e Quercetina nos vinhos algarvios.

O maior poder antioxidante foi verificado nos vinhos tintos, nomeadamente, no vinho Morgado do Quintão Negra Mole, que apresentava igualmente maior teor em polifenóis totais.

5. Referências bibliográficas

- Alpuim, J.P. (1997). Aprendendo a Química do Vinho. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 15. <https://doi.org/10.52590/M3.P589.A3000791>
- Archela, E., & Dall'Antonia, L. (2014). Determination of Phenolic Compounds in Wine: A Review. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 34. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2013v34n2p193>
- Arruda, A. M. (1999). O Algarve nos séculos V e IV a. C. In: O Algarve da Antiguidade aos nossos dias, Marques, M.G.M., Edições Colibri, Lisboa, pp.23-31.
- Avizcuri, J.-M., Sáenz-Navajas, M.-P., Echávarri, J.-F., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2016). Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage. *Food Chemistry*, 213, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.050>
- Badocco, D., Lavagnini, I., Mondin, A., & Pastore, P. (2014). Estimation of the uncertainty of the quantification limit. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 96, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.03.013>
- Belmiro, T. M. C., Pereira, C. F., & Paim, A. P. S. (2017). Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. *Microchemical Journal*, 133, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.018>
- Bernardes, J. P., & Fontes, J. L. (Eds.). (2006). *A vinha e o vinho no Algarve: O renascer de uma velha tradição*. Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve.
- Bernardes, J.P. & Oliveira, L. F.(2006). *A Vinha e o Vinho no Algarve: O renascer de uma velha tradição, coord. de João Pedro Bernardes e Luís Filipe Oliveira, Faro, Eds. Afrontamento / CCDRALg, 2006.* https://www.academia.edu/25651729/A_Vinha_e_o_Vinho_no_Algarve_O_renascer_de_uma_velha_tradi%C3%A7%C3%A3o_coord_de_Jo%C3%A3o_Pedro_Bernardes_e_Lu%C3%ADs_Filipe_Oliveira_Faro_Eds_Afrontamento_CCDRALg_2006
- Broinizi, P. R. B., Andrade-Wartha, E. R. S. de, Silva, A. M. de O. e, Novoa, A. J. V., Torres, R. P., Azeredo, H. M. C., Alves, R. E., & Mancini-Filho, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 902–908. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400035>
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Di Minno, G., & Ritieni, A. (2019). Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*, 24(19), 3626. <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.017>
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 1–15. <https://doi.org/10.21548/39-2-3164>
- Chudzińska, M., Rogowicz, D., Wołowicz, Ł., Banach, J., Sielski, S., Bujak, R., Sinkiewicz, A., & Grześk, G. (2021). Resveratrol and cardiovascular system—The unfulfilled hopes. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*, 190(3), 981–986. <https://doi.org/10.1007/s11845-020-02441-x>
- Coelho, E. M., da Silva Padilha, C. V., Miskinis, G. A., de Sá, A. G. B., Pereira, G. E., de Azevêdo, L. C., & dos Santos Lima, M. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and

- characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Comuzzo, P., & Battistutta, F. (2019). Chapter 2—Acidification and pH Control in Red Wines. Em A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 17–34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00002-5>
- Concenço, F., Brotto, G., & Nora, L. (2019). Grape Wine and Juice: Comparison on Resveratrol Levels. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 6, 378–386. <https://doi.org/10.22161/ijaers.6.4.44>
- Cosme, F., Nunes, F. M., & Filipe-Ribeiro, L. (2021). *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*. BoD – Books on Demand.
- Curvelo-Garcia, A., & Barros, P. (2015). *Química Enológica-métodos Analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade dos vinhos e de outros produtos vitivinícolas*.
- Czaplicki, S. (2013). *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds* (pp. 99–122). <https://doi.org/10.5772/55620>
- Dalicuba, M., Nel, A. P., & van Jaarsveld, F. P. (2021). Ascorbic Acid Derivatives in the Sauvignon Blanc Cultivar (*Vitis vinifera* L.) During Berry Development in the Wellington and Elgin Regions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 184–192. <https://doi.org/10.21548/42-2-4394>
- Damin, F., Meinhart, A., Miranda, L., Filho, M., Silva, L., Constant, L., & Wagner, R. (2019). Determination of rutin in fruits and vegetables in natura. *Journal of food and nutrition research*, 58, 328.
- De Klerk, J.-L. (2010). *Succinic acid production by wine yeasts* [Thesis, Stellenbosch : University of Stellenbosch]. <https://scholar.sun.ac.za:443/handle/10019.1/4228>
- Decreto-Lei n.º 299/90 / DRE.* (sem data). Diário da República Eletrónico. Obtido 2 de Março de 2022, de <https://dre.pt/>
- Decreto-Lei n.º 318/2003 / DRE.* (sem data). Diário da República Eletrónico. Obtido 2 de Março de 2022, de <https://dre.pt/>
- Dias, F. de S., David, J. M., & David, J. P. (2016). Determination of Phenolic Acids and Quercetin in Brazilian Red Wines from Vale do São Francisco Region Using Liquid-Liquid Ultrasound-Assisted Extraction and HPLC-DAD-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27, 1055–1059. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150363>
- DuBois, A., Shelton, M., Qian, M., & Osborne, J. p. (2021). Effect of malolactic fermentation and ageing on the concentration of p-coumaric acid of Pinot Noir wine and the consequence for volatile phenol production by Brettanomyces. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27(1), 81–86. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12464>
- Fardelone, L. C., Jesus, T. dos S. B. de, Silveira, G. C. da, David, Y. P., Valença, G. P., & Moran, P. J. S. (2021). Organic Acid Production by Biotechnology. Em *Environment and Innovation Strategies to Promote Growth and Sustainability*. CRC Press.
- Fernando, C. D., & Soysa, P. (2016). Simple isocratic method for simultaneous determination of caffeine and catechins in tea products by HPLC. *SpringerPlus*, 5(1), 970. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2672-9>
- Ferreira-Lima, N., Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Pinasseau, L., Verbaere, A., Bordignon-Luiz, M. T., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2018). Quantification of hydroxycinnamic derivatives in wines by UHPLC-MRM-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3483–3490. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0759-y>
- Galego, L., & Da Silva, J. P. (2020). Transformation of Anthocyanins During Preparation of Rose Wine by Following a Pre-fermentative Cold Maceration Process. Em J. Monteiro, A. João Silva, A. Mortal, J. Aníbal, M. Moreira da Silva, M. Oliveira, & N. Sousa (Eds.),

- INCREaSE 2019* (pp. 246–251). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30938-1_20
- Galego, Ludovina Rodrigues. (2015). *Bebidas espirituosas do Algarve*. Dissertação de doutoramento em Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.
- Garrido-Delgado, R., López-Vidal, S., Arce, L., & Valcárcel, M. (2009). Differentiation and identification of white wine varieties by using electropherogram fingerprints obtained with CE. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3809–3816. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900342>
- Gaspar, P., & Pinto, J. (2012). *Guia do Turismo de Natureza do Algarve*.
- Gerogiannis, O., Daskalakis, I., Bouza, D., & Stavrakaki, M. (2018). Study of Some Qualitative and Quantitative Characters of the Grapes of Indigenous Greek Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) using HPLC and Spectrophotometric Analyses. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 97–106. <https://doi.org/10.15835/nbha46111008>
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A., & Spanos, M. (2006). Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17(9), 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.04.006>
- Gerogiannis, O., Daskalakis, I., Bouza, D., & Stavrakaki, M. (2018). Study of Some Qualitative and Quantitative Characters of the Grapes of Indigenous Greek Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) using HPLC and Spectrophotometric Analyses. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 97–106. <https://doi.org/10.15835/nbha46111008>
- Gramza-Michałowska, A., Bueschke, M., Kulczyński, B., Gliszczyńska-Świgło, A., Kmiecik, D., Bilka, A., Purlan, M., Wałęsa, L., Ostrowski, M., Filipczuk, M., & Jędrusek-Golińska, A. (2019). Phenolic compounds and multivariate analysis of antiradical properties of red fruits. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 1739–1747. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00091-x>
- Gross, J. H. (2004). *Mass spectrometry: A textbook*. Springer.
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules*, 26(3), 718. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
- Infovini | O portal do vinho português | Castas*. (sem data). Obtido 25 de Março de 2022, de <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=45&codCasta=10>
- Ivanova-Petropulos, V., Naceva, Z., Sándor, V., Makszin, L., Deutsch-Nagy, L., Berkics, B., Stafilov, T., & Kilár, F. (2018). Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic, and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS. *ELECTROPHORESIS*, 39(13), 1597–1605. <https://doi.org/10.1002/elps.201700492>
- Ivanova-Petropulos, V., Petruševa, D., & Mitrev, S. (2020). Rapid and Simple Method for Determination of Target Organic Acids in Wine Using HPLC-DAD Analysis. *Food Analytical Methods*, 13(5), 1078–1087. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01724-4>
- IVV. (sem data). *Anuário IVV, IP*. IVV. Obtido 22 de Março de 2022, de <http://www.ivv.gov.pt/np4/home/1736.html>
- Izquierdo-Llopert, A., Carretero, A., & Saurina, J. (2020). Organic Acid Profiling by Liquid Chromatography for the Characterization of Base Vines and Sparkling Wines. *Food Analytical Methods*, 13. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01808-1>
- Izquierdo-Llopert, A., & Saurina, J. (2019). Characterization of Sparkling Wines According to Polyphenolic Profiles Obtained by HPLC-UV/Vis and Principal Component Analysis. *Foods*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.3390/foods8010022>

- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3. ed). Elsevier.
- Kalathenos, P., Sutherland, J. P., & Roberts, T. A. (2008). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 78, 245–250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05023.x>
- Kanavouras, A., Coutelieris, F., Karanika, E., Kotseridis, Y., & Kallithraka, S. (2020). Color change of bottled white wines as a quality indicator. *OENO One*, 54(3), 543–551. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.3.3367>
- Lanças, F. M. (2009). A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, 1(2), 27.
- Leal, C., Santos, R. A., Pinto, R., Queiroz, M., Rodrigues, M., José Saavedra, M., Barros, A., & Gouvinhas, I. (2020). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1009–1015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.013>
- Loureiro, N. (2016). *Cartografias de Solos disponíveis para o Algarve*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3882.6640>
- Maçanita, J. (2017). *A NEGRA MOLE: FONTE DE HISTÓRIA VITÍCOLA DO ALGARVE*. 3.
- Manuela, M., Almandanim, M. C., Baleiras-Couto, M., Sofia, H., Carneiro, L. C., Fevereiro, P., & Eiras-Dias, J. (2019). *APTIDÃO CULTURAL E AGRONÓMICA*: 4.
- Mardones, C., Hitschfeld, A., Contreras, A., Lepe, K., Gutiérrez, L., & von Baer, D. (2005). Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *Journal of Chromatography A*, 1085(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.022>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- Mendoza, L., Matsuhiro, B., Aguirre, M. J., Isaacs, M., Sotés, G., Cotoras, M., & Melo, R. (2011). CHARACTERIZATION OF PHENOLIC ACIDS PROFILE FROM CHILEAN RED WINES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 56(2), 688–691. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072011000200014>
- Merkytė, V., Longo, E., Windisch, G., & Boselli, E. (2020). Phenolic Compounds as Markers of Wine Quality and Authenticity. *Foods*, 9(12), 1785. <https://doi.org/10.3390/foods9121785>
- Mira, H., Libório, J., Rodrigues, D., Torgal, I., Ricardo-da-Silva, J., & Caldeira, I. (2021). Impacto da hiperoxigenação do mosto no perfil aromático de vinho branco da casta Fernão Pires. *Revista da UI_IPSantarém - Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém*, 9(3), 92–103. <https://doi.org/10.25746/ruiips.v9.i3.26205>
- Miranda, A. B. (2021, Setembro 28). O que é um vinho gastronômico? | Sociedade da Mesa. *Revista*. <https://revista.sociedadedamesa.com.br/2021/09/vinho-gastronomico/>
- Mota, A., Pinto, J., Fartouce, I., Correia, M. J., Costa, R., Carvalho, R., Aires, A., & Oliveira, A. A. (2018). Chemical profile and antioxidant potential of four table grape (*Vitis vinifera*) cultivars grown in Douro region, Portugal. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 33(2), 125–135. <https://doi.org/10.1051/ctv/20183302125>
- Nielsen, M. K., & Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, 24(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.005>

- Nyman, N. A., & Kumpulainen, J. T. (2001). Determination of Anthocyanidins in Berries and Red Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4183–4187. <https://doi.org/10.1021/jf010572i>
- Oiv-ma-as313-02.pdf*. (sem data). Obtido 24 de Fevereiro de 2022, de <https://www.oiv.int/public/medias/3728/oiv-ma-as313-02.pdf>
- Olego, M. a., Álvarez, J. c., Tobes, A., de Paz, J. m., Coque, J. j. r., & Garzón-Jimeno, E. (2016). Determining optimum harvest time under Mediterranean conditions: Developing a new model for measuring L-malic acid concentration in red grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), 232–239. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12181>
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.017>
- Pastor, R. F., Restani, P., Di Lorenzo, C., Orgiu, F., Teissedre, P.-L., Stockley, C., Ruf, J. C., Quini, C. I., García Tejedor, N., Gargantini, R., Aruani, C., Prieto, S., Murgo, M., Videla, R., Penissi, A., & Iermoli, R. H. (2019). Resveratrol, human health and winemaking perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1237–1255. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1400517>
- Paulo, L., Domingues, F., Queiroz, J. A., & Gallardo, E. (2011). Development and Validation of an Analytical Method for the Determination of trans- and cis-Resveratrol in Wine: Analysis of Its Contents in 186 Portuguese Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2157–2168. <https://doi.org/10.1021/jf105004y>
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhela, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Peretti, S., Moreira, M., Barreto, G., & Pedriali, C. (2015). Resveratrol para cosméticos no clareamento da pele. *InterfacEHS – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade*, 10, 3–16.
- Picariello, L., Rinaldi, A., Martino, F., Petracca, F., Moio, L., & Gambuti, A. (2019). Modification of the organic acid profile of grapes due to climate changes alters the stability of red wine phenolics during controlled oxidation. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 58, 127–133. <https://doi.org/10.5073/vitis.2019.58.special-issue.127-133>
- Prasongsidh, B. C., & Skurray, G. R. (1998). Capillary electrophoresis analysis of trans- and cis-resveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine. *Food Chemistry*, 62(3), 355–358. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00153-2)
- Pullinger, A. G., & Monteiro, A. A. (1988). Functional impairment in TMJ patient and nonpatient groups according to a disability index and symptom profile. *Cranio*, 6(2), 156–164. <https://doi.org/10.1080/08869634.1988.11678233>
- Regulamento Delegado (UE) 2019/934 da Comissão de 12 de março de 2019 que completa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita às zonas vitícolas em que o título alcoométrico pode ser aumentado, às práticas enológicas autorizadas e às restrições aplicáveis à produção e conservação dos produtos vitivinícolas, à percentagem mínima de álcool dos subprodutos e à sua eliminação, bem como à publicação das fichas da OIV. (sem data).

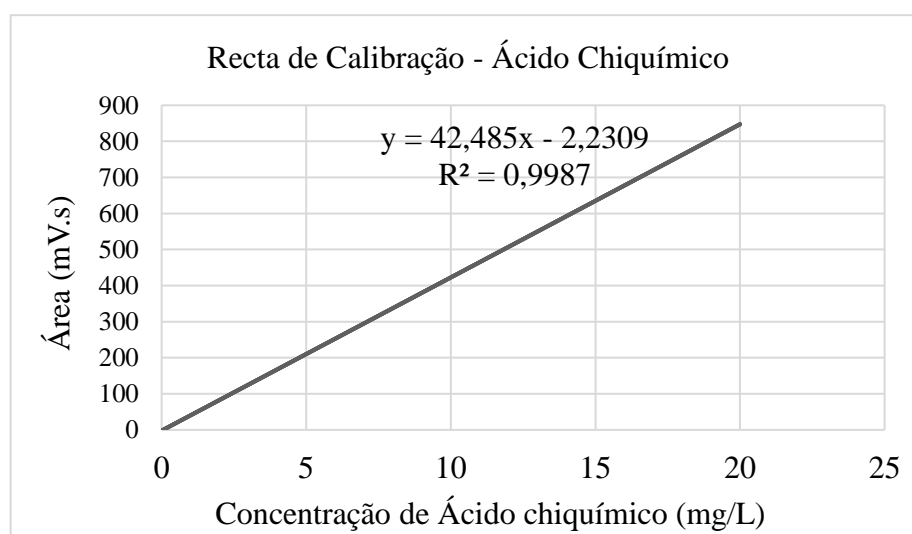
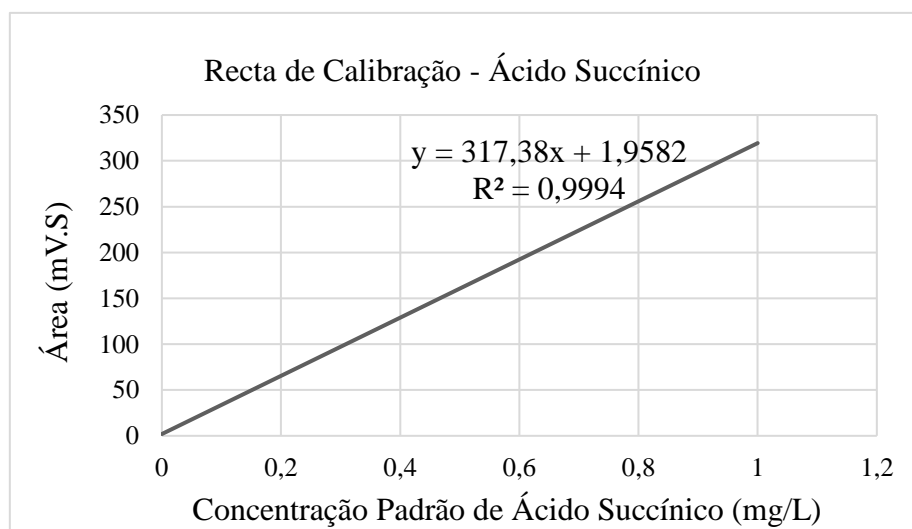
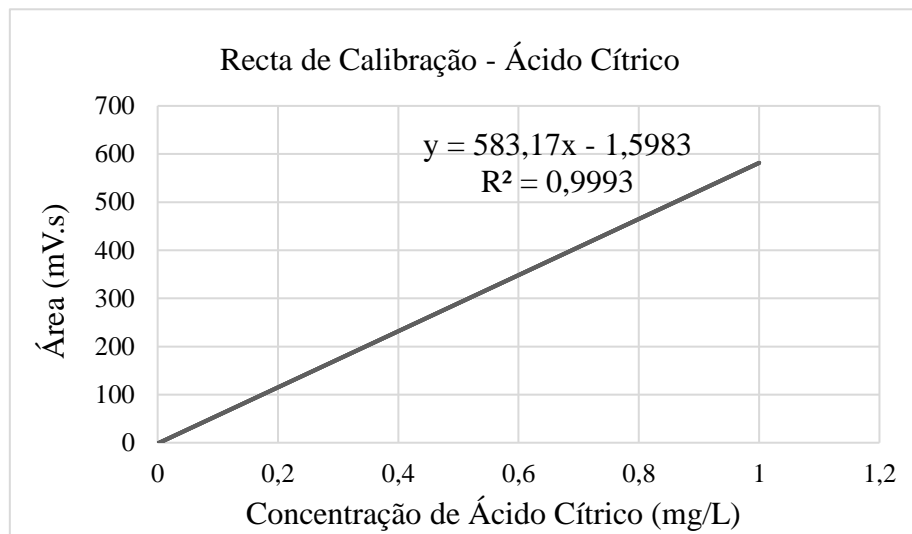
Regulamento (CE) n.º 606/2009 da Comissão de 10 de Julho de 2009 que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis. (sem data). 59.

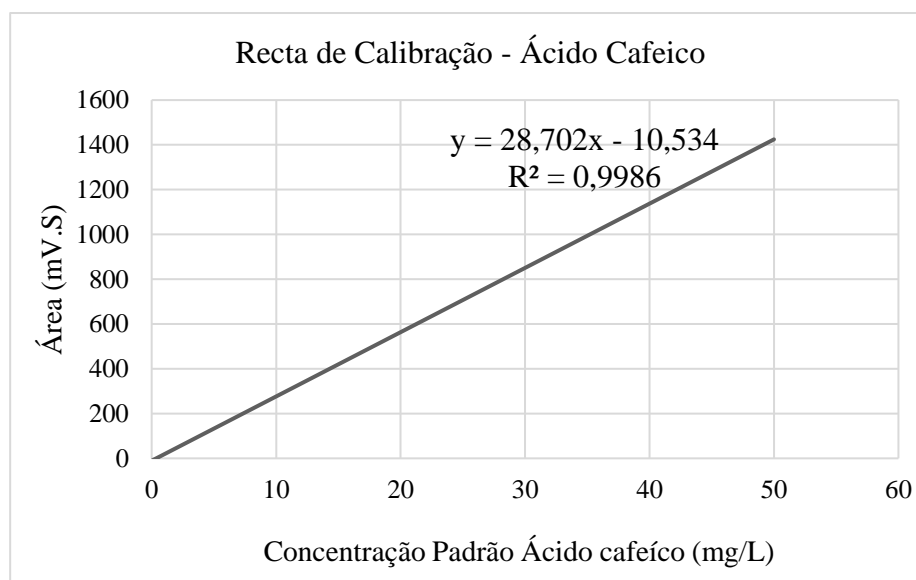
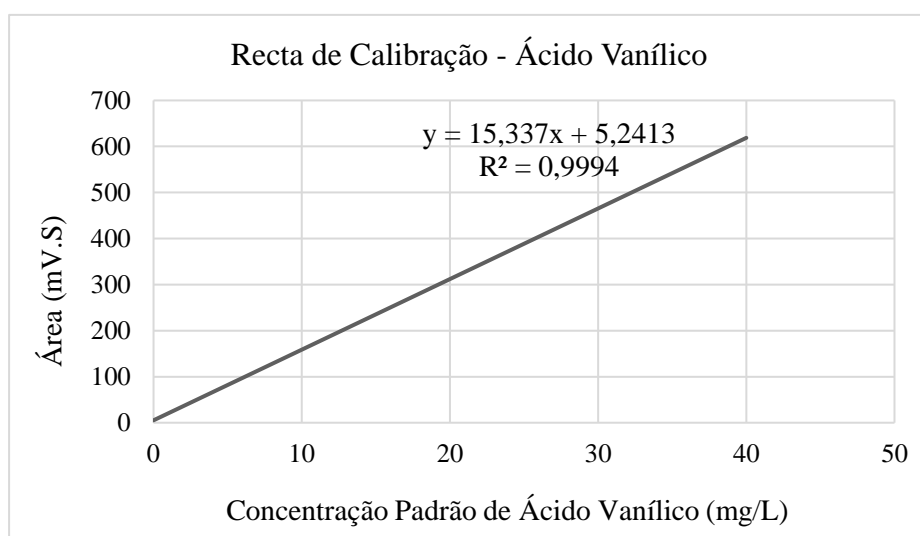
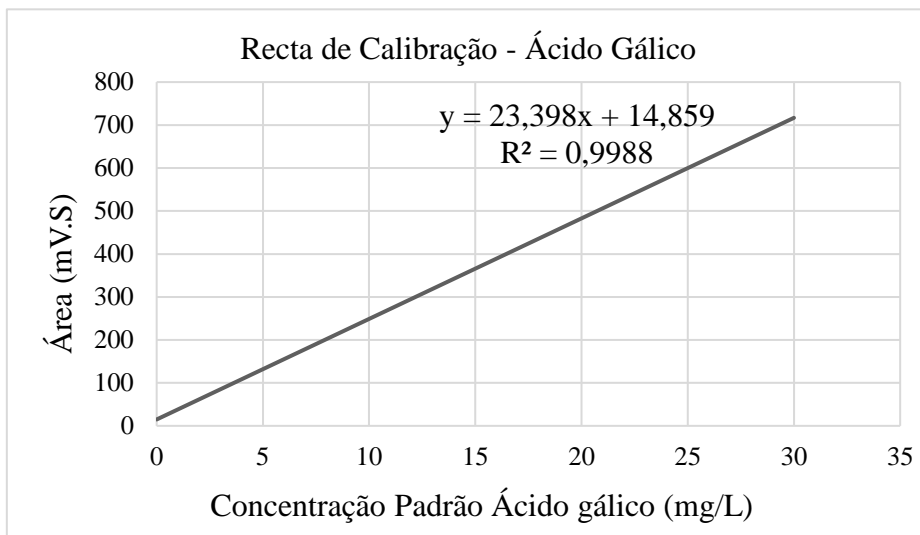
- Regulamento (CE) n.º 491/2009 do Conselho, de 25 de Maio de 2009, que altera o Regulamento (CE) n.º 1234/2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento OCM única).* (sem data). 56.
- Regulamento (CE) n.º 1493/99, do Conselho, de 17 de Maio.* IVV. Obtido 2 de Março de 2022, de <https://www.ivv.gov.pt/np4/URL: http://127.0.0.1:8081/np4/663>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., & Donèche, B. (2006). *Handbook of enology* (2nd ed). John Wiley.
- Rizzon, L. A., & Miele, A. (2001). Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha. *Ciência Rural*, 31(5), 893–895. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500027>
- Rizzon, L. A., & Sganzerla, V. M. A. (2007). Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural*, 37(3), 911–914. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300053>
- Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., & Płotka-Wasyłka, J. (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115630. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>
- Santos, C., Botelho, G., Caldeira, I., Torres, A., & Ferreira, F. M. (2014). Antioxidant activity assessment in fruit liquors and spirits: Methods comparison. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 29(1), 28–34. <https://doi.org/10.1051/ctv/20142901028>
- Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>
- Scott, R. P. W. (2012). *Principles and Practice of Chromatography*. Reese-Scott Partnership.
- Silva, L. R., & Queiroz, M. (2016). Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.015>
- Simonetti, L. M. (2018). *Sistemas de condução e porta-enxerto para cultivares de uva para vinho*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/181542>
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043>
- Sterneder, S., Stoeger, V., Dugulin, C. A., Liszt, K. I., Di Pizio, A., Korntheuer, K., Dunkel, A., Eder, R., Ley, J. P., & Somoza, V. (2021). Astringent Gallic Acid in Red Wine Regulates Mechanisms of Gastric Acid Secretion via Activation of Bitter Taste Sensing Receptor TAS2R4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(36), 10550–10561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03061>
- Sumbly, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), 8111–8132. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5976-0>
- Tessini, C., Mardones, C., Rivas, L., & von Baer, D. (2009). Measurement uncertainty of shikimic acid in red wines produced in Chile. *Accreditation and Quality Assurance*, 14. <https://doi.org/10.1007/s00769-009-0543-6>
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with

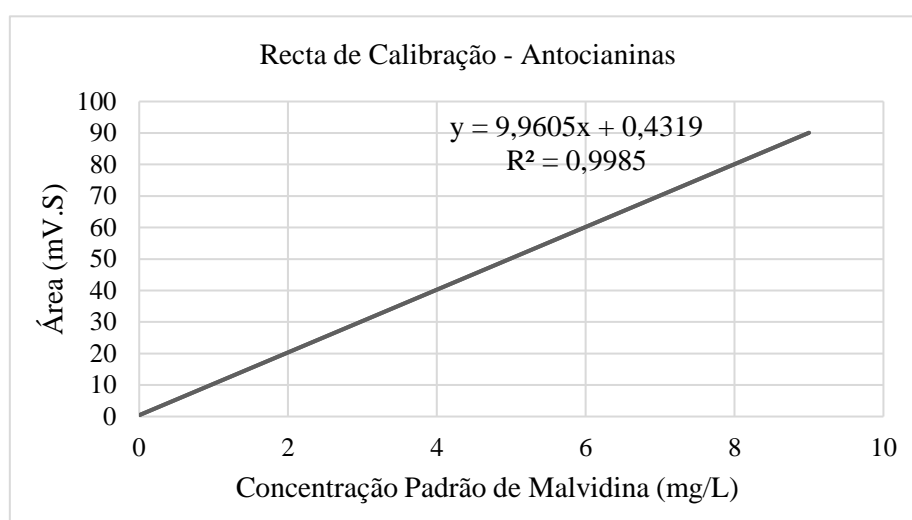
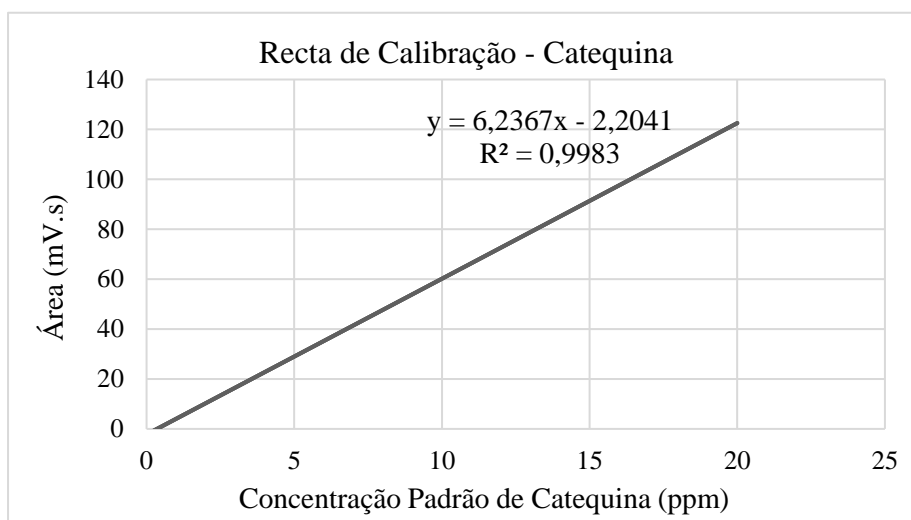
- antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
- Ughetto, V.R., O. (2018). *A Negra Mole*. 2.
- Vinhos do Algarve—O Renascer de uma Região. (sem data). *IDTOUR - unique solutions*. Obtido 2 de Novembro de 2021, de <https://idtour.pt/nossos-projetos/vinhos-algarve-renascer-regiao/>
- Visioli, F., Panaite, S.-A., & Tomé-Carneiro, J. (2020). Wine's Phenolic Compounds and Health: A Pythagorean View. *Molecules*, 25(18), 4105. <https://doi.org/10.3390/molecules25184105>
- Volschenk, H., Vuuren, H., & Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27, 123–136. <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>
- Zhang, A., Wan, L., Wu, C., Fang, Y., Han, G., Li, H., Zhang, Z., & Wang, H. (2013). Simultaneous Determination of 14 Phenolic Compounds in Grape Canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength Switching Detection. *Molecules*, 18(11), 14241–14257. <https://doi.org/10.3390/molecules181114241>
- Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., & Nemitlu, E. (2020). Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 113509. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509>
- Zeravik, J., Fohlerova, Z., Milovanovic, M., Kubesa, O., Zeisbergerova, M., Lacina, K., Petrovic, A., Glatz, Z., & Skladal, P. (2016). Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food Chemistry*, 194, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.013>

6. Anexos

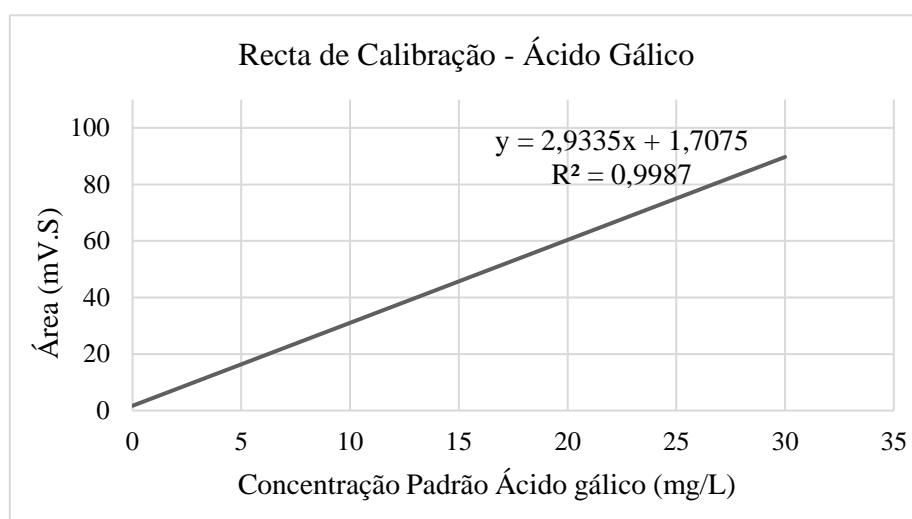
Anexo I – Curvas de calibração obtidas por HPLC para cada analito estudado preparado a partir de uma solução-mãe hidroalcolica a 15%, com respetiva equação da reta.

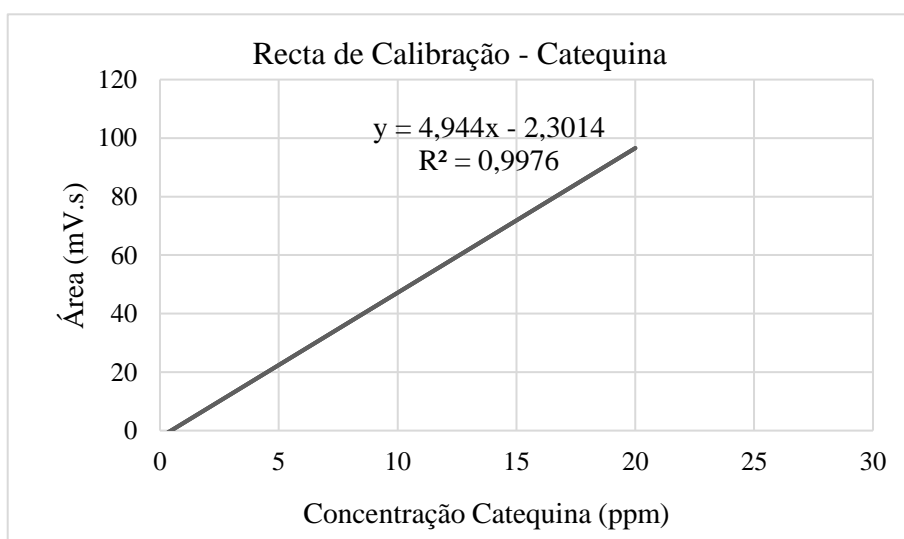
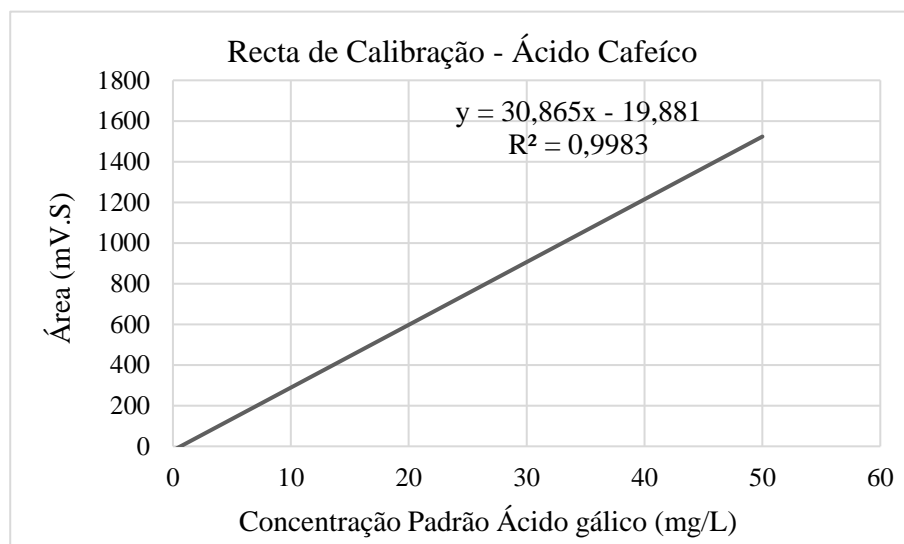
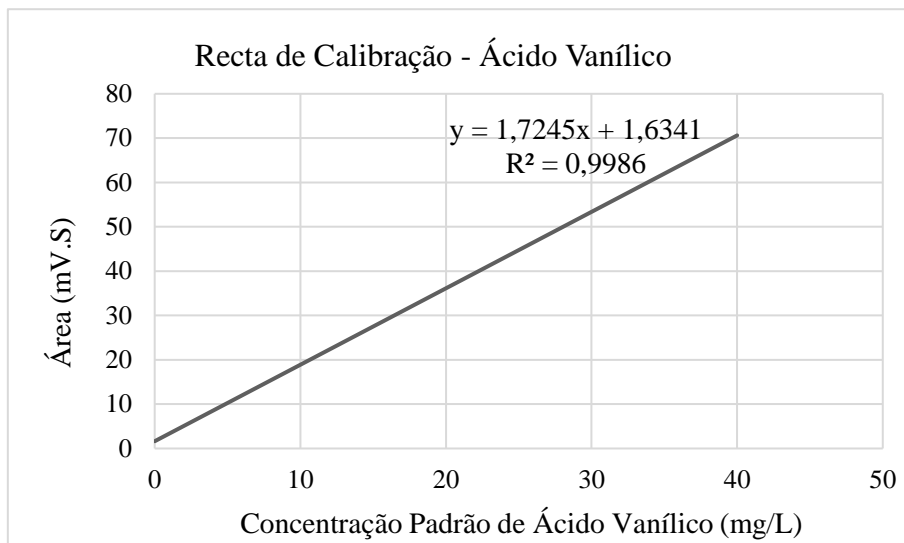


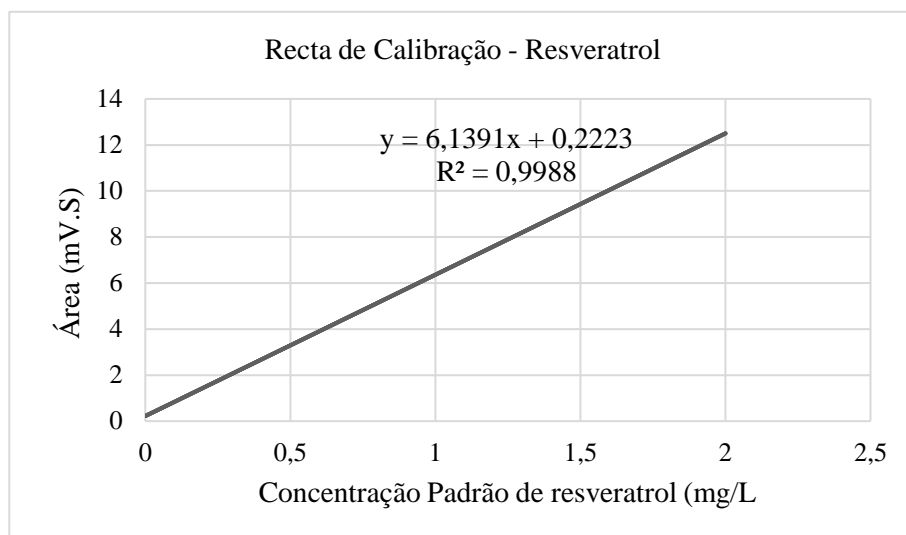
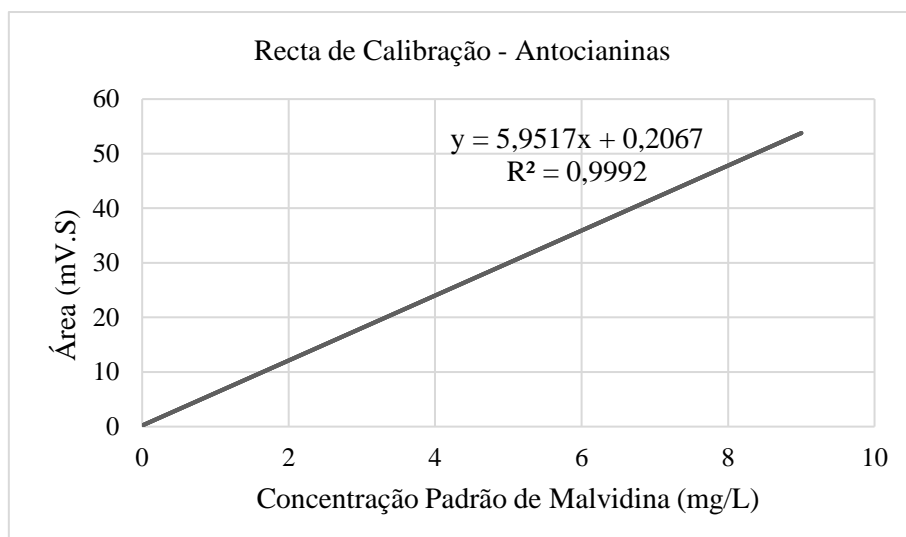




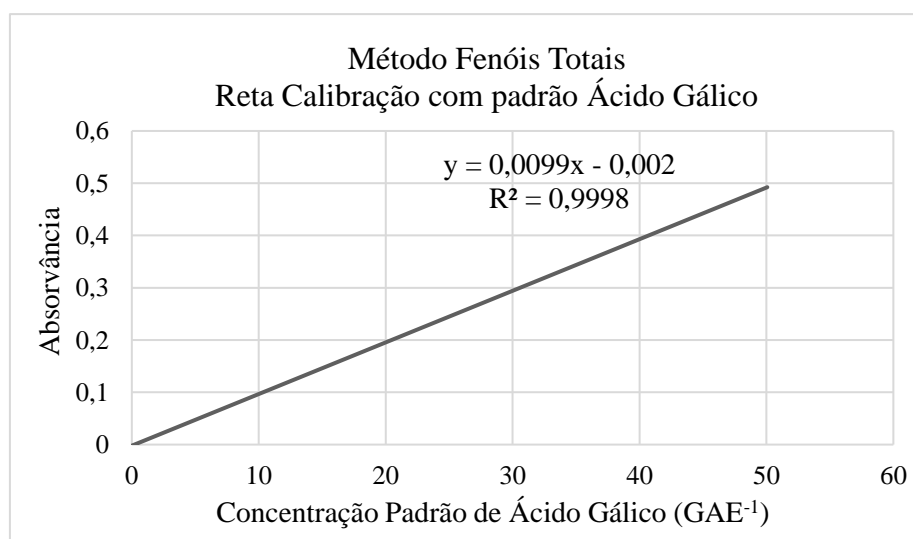
Anexo II– Curvas de calibração obtidas por HPLC para cada analito estudado preparado a partir de uma solução-mãe hidroalcoólica a 100%, com respetiva equação da reta.







Anexo III- Retas de calibração obtidas para determinação dos fenóis totais



Contribution to the chemical characterization of Algarve grapes and wines natives' varieties "Negra Mole" and "Crato Branco"

Marcos J.,¹ Francisco, V.¹, Serra, M.^{2,5}, Galego, L.^{1,3} Afonso, C.^{4,5}

¹ Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139. Faro

² Escola de Hotelaria e Turismo de Vila Real de Santo António, Rua Dr. Teófilo Braga, 8900 – 303 Vila Real de Santo António

³MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro.

⁴Escola Superior de Gestão, Hotelaria e Turismo, Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro

⁵ CITUR – Escola Superior de Gestão, Hotelaria e Turismo, Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro

Email: lgalego@ualg.pt

The Algarve wine region is in the southernmost of Portugal and it is characterized by climatic conditions, namely the Atlantic Ocean maritime influence, the presence of mountains in the north and the approximately 3000 hours of sunshine per year. However, the most important factor in the identity and character of Algarve wines is the diversity of its viticulturally heritage. The identity of Algarve wines is the native grape varieties, the red grape variety "Negra Mole" and the white grape variety "Crato Branco" or "Síria". The "Negra Mole" was the basis for the famous *clarete* and *palhete* Algarve wines¹. This variety has a peculiarity of containing red, white and rose berries in the same grapes bunch. If a gently pressed is used a fresh white wine can be obtained. An intense press originates a fruity and fresh light rose wine. When macerated for a long time, light red wines are found. "Crato Branco", is a white native grape variety that produces fruity wines with citrus aromas. Most of the wines produced by this variety are fortified and originate unique wines in Portugal. According to some authors, the quality of a wine is directly related to the chemical composition of the grapes. Grapes are considered one of the largest sources of phenolic compounds compared to other fruits and vegetables. Different grape varieties result in different organoleptic and sensory characteristics (flavour and colour). The presence of certain organic acids in the grapes also affects the organoleptic characteristics of the wines. The main objective of the present work was to study the organic acids and phenolic compounds in these two autoctone grape varieties.

Tartaric, malic, lactic, gallic, vinylic, caffeic, shikimic and citric acids, catechin anthocyanins and resveratrol were analysing using reverse-phase high efficiency liquid chromatography at different wavelengths^{2,3}.

"Negra Mole" variety having the highest concentrations of tartaric acid (387.9 ± 0.6 mg/kg dry weight) and "Crato Branco" the highest content of malic acid (141.2 ± 0.2 mg/kg dry weight). The amounts of shikimic acid and citric acid detected in the two native grape varieties were very low. The highest amount of resveratrol (3.54 ± 0.01 µg/g dry weight) and anthocyanins as expected, was also found in "Negra Mole" grapes skin (0.07 ± 0.01 mg/g dry weight). In general, the red grape variety "Negra Mole" has a higher content of phenolic acids and the "Crato Branco" grape variety has a higher content of organic acids. In the Algarve wines studied, it was found that the red wines obtained from the "Negra Mole" grape variety presented a higher quantity of tartaric acid (6.13 ± 0.03 g/L) as found in grapes from the same variety, figure 1.

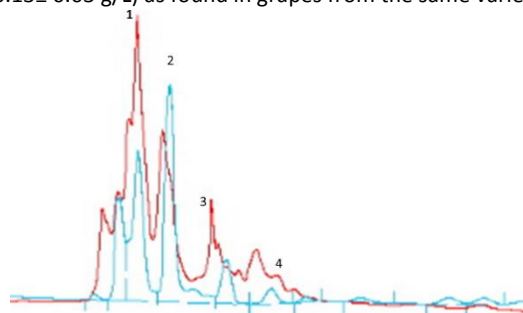


Figure: 1 - "Negra Mole" chromatogram grape (blue) and wine (red). 1 – tartaric acid, 2 – malic acid, 3- lactic acid e 4 – citric acid

The amount of malic acid in the analysed red and white Algarve wines were very similar. As observed in the grapes, the concentrations of shikimic and citric acid in the wines were not detected or were detected in very low concentrations, almost inexistent. Anthocyanins were only quantified in rose and red wines produced from the "Negra Mole" grape variety and their concentration was higher in red wines (420.56 ± 0.01 mg/L). In rose wines, the anthocyanins content can vary from 1 to 13 mg/L depending on the production technology used. Curiously, the highest amount of resveratrol was not detected in the red and rose wines as it happens with the grapes but in the white wines produced from the white "Crato Branco" variety (9.94 ± 0.01 mg/l).

Phenolic compounds play an important role in the quality of wine, particularly on colour and astringency.⁴ A phenolic compound more detailed study is necessary to improve the knowledge of these grape varieties and the wines produced by them.

Acknowledgements: We would like to thank “Quinta da Tor” the grape and wine samples.

Funding: This work was financially supported by European Structural and Investment Funds (FEEL) - Feder, within the scope of the project SAICT-ALG/39590/2018.

References

- 1- J. Maçanita. Historia Vitícola do Algarve (3).
- 2- A. Robles, M. Fabjanowicz, T. Chmiel, J. Plotka-Wasyłka. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 120 (2019), 115630.
- 3- K. Tašeo, M. Stefova, V. Ivanova-Petropulos, Maced. J. Chem. Chem. Eng. 35 (2) (2016) 225-233.
- 4- A. Victoria, O.A. Antoche, I. Geana, Ovidius Uni Annals of Chem. 25 (1), (2014) 47-52.

Publicação selecionada para Comunicação em Painel e publicada no livro de resumos do(a) XVI Encontro de Química dos Alimentos, XVIEQA.

Publicação :: Aceite

Caro(a)/Dear Ludovina Rodrigues Galego,

Temos o prazer de informar que a sua publicação foi selecionada para Comunicação em Painel e será publicada no livro de resumos do(a) XVI Encontro de Química dos Alimentos, XVIEQA.

Participante: Ludovina Rodrigues Galego

Título da Publicação: Contribution to the chemical characterization of Algarve grapes and wines natives' varieties “Negra Mole” and “Crato Branco”

Tipo de apresentação: Comunicação em Painel

Mais informações sobre a apresentação serão disponibilizadas no devido tempo. Esteja atento ao seu e-mail e às atualizações na página do encontro.

Caso necessite de alguma informação adicional contacte por favor a comissão organizadora.

Com os melhores cumprimentos/ Best regards,

Ofélia Anjos

ofelia@ipcb.pt

(Chairman XVI EQA)