

EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS  
NO ENVELHECIMENTO DO VINHO (1)

POR

J. M. R. ESTEVES-PINTO

(Laboratório Ferreira Lapa, Instituto Superior de Agronomia)

ÍNDICE

INTRODUÇÃO . . . . .	2
I — PRIMEIRA PARTE . . . . .	2
1 — ENVELHECIMENTO DO VINHO. CONSIDERAÇÕES GERAIS . . . . .	2
2 — COMPOSTOS FLAVONOIDES . . . . .	3
3 — COMPOSTOS FLAVÓNICOS . . . . .	4
a) — Propriedades . . . . .	6
b) — Extração . . . . .	7
c) — Eluentes . . . . .	9
d) — Suportes . . . . .	11
e) — Identificação . . . . .	12
f) — Os flavonóis na uva e no vinho . . . . .	14
4 — COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS . . . . .	16
a) — Propriedades das antocianas . . . . .	17
b) — Antocianidinas . . . . .	20
c) — Antocianas na uva e no vinho e a sua evolução . . . . .	23
d) — Extração e purificação das antocianas . . . . .	24
e) — Eluentes . . . . .	27
f) — Suportes . . . . .	29
g) — Identificação . . . . .	30
h) — Isolamento, purificação e identificação das antocianidinas obtidas por hidrólise ácida do vinho . . . . .	34

(1) Estudo efectuado em vinhos da Adega Cooperativa do Fundão (1969).

Recebido para publicação em 11/2/971.

5 — TANINOS . . . . .	34
a) — Os taninos da uva e do vinho . . . . .	37
II — SEGUNDA PARTE . . . . .	39
6 — MATERIAL . . . . .	39
7 — MÉTODOS . . . . .	40
8 — RESULTADOS . . . . .	43
9 — DISCUSSÃO E CRÍTICA . . . . .	51
10 — CONCLUSÕES . . . . .	54
RÉSUMÉ . . . . .	56
AGRADECIMENTOS . . . . .	58
BIBLIOGRAFIA . . . . .	58
APÊNDICE . . . . .	65

## INTRODUÇÃO

ESTUDA-SE a evolução dos compostos polifenólicos com o decorrer do envelhecimento nos vinhos da Adega Cooperativa do Fundão.

Numa primeira parte descrevemos quimicamente estes compostos e indicamos as propriedades mais notáveis, processos de extracção, purificação e identificação mais usuais, bem como os eluentes e suportes mais vulgarmente utilizados na técnica de cromatografia em camada fina.

Na segunda parte descreve-se o material e métodos e indicam-se os resultados que são apreciados criticamente com vista à obtenção de conclusões.

### I — PRIMEIRA PARTE

#### 1 — ENVELHECIMENTO DO VINHO. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Se bem que exista unanimidade quanto a uma ideia-base do envelhecimento dos vinhos — o envelhecimento fenómeno dinâmico ligado à ideia de tempo — as divergências e contradições entre os autores surgem logo de início ao tentarem interpretá-lo.

De facto trata-se de um fenómeno cujo estudo apresenta complexas dificuldades dado que as modificações sofridas no decorrer do tempo são função de diferentes factores normais

e acidentais, não se mantendo estas constantes para cada tipo de vinho.

Assim, para RIBÉREAU-GAYON & PEYNAUD (1966), «o período de maturação ou de formação é aquele durante o qual o vinho desenvolve as suas qualidades gustativas e adquire a limpidez e estabilidade que corresponde ao período de envasilhamento em pipo; e o envelhecimento pròpriamente dito, aquele que se processa em garrafa acompanhado de uma clarificação progressiva».

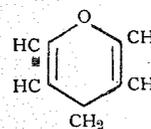
Já diferentemente MILISAVLJEVIC (1965) entende, ao pretender definir os conceitos maturação e envelhecimento, que «... Estes termos não têm o mesmo significado para todos os autores...» e conclui: «... No primeiro, o vinho ganha qualidade (maturação) enquanto que no segundo ele perde qualidade (envelhecimento)...»

Contudo, não tomando posição em favor dum ou doutro autor, é porém facto incontroverso irem evoluindo a coloração e adstringência com o desenvolver do envelhecimento, assumindo particular importância, nesta transformação, os compostos polifenólicos que constituem o assunto do presente trabalho.

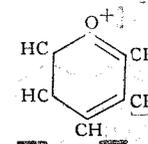
### 2 — COMPOSTOS FLAVONOIDES

São os flavonoides compostos polifenólicos constituídos por uma estrutura comum em C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, na qual os dois ciclos benzénicos estão ligados por uma cadeia em C<sub>3</sub>, diferente segundo a natureza do flavonoide (RIBÉREAU-GAYON, 1963).

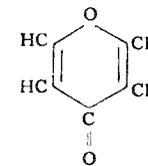
Estes compostos variam quanto à natureza do heterociclo oxigenado que deriva das estruturas do pirano, pirílio e  $\gamma$ -pirona,



Pirano

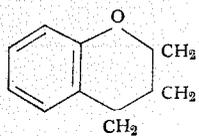


Pirílio

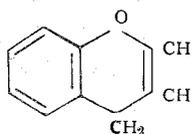


$\gamma$ -Pirona

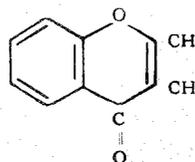
heterociclos estes designados por cromano, cromeno e cromono e de fórmula de estrutura,



Cromano



Cromeno

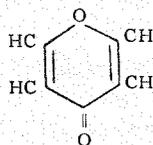


Cromono

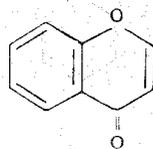
A substituição dum hidrogénio por um radical fenil nos heterociclos oxigenados, origina as estruturas bases dos flavonoides dos quais estudaremos particularmente os compostos flavónicos, antociânicos e tânicos por serem quantitativamente mais importantes, e provávelmente os de influência mais decisiva sobre as características organolépticas dum vinho.

### 3 — COMPOSTOS FLAVÓNICOS

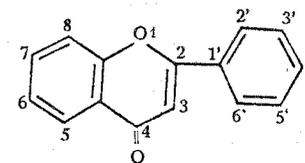
Responsáveis pelas colorações amarelas, os pigmentos flavónicos possuem um grupo fundamental que deriva da  $\gamma$ -pirona (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).



designado  $\alpha$ ,  $\beta$ -benzo- $\gamma$ -pirona ou cromono (COSTA, 1967),

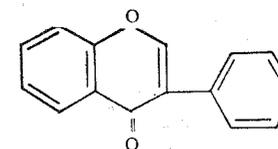


que origina pela substituição dum hidrogénio por um grupo fenilo o 2-fenil benzopirona (GRIPENBERGER, 1962; FERRÃO, 1963)



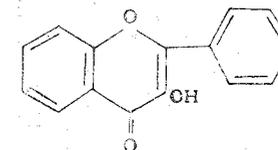
que é a estrutura base das flavonas.

Se a substituição do hidrogénio pelo grupo fenilo se efectua na posição 3 em lugar da posição 2 obtém-se uma isoflavona,

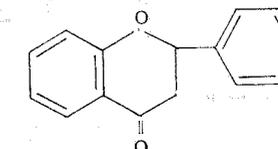


verificando-se também o aparecimento doutros compostos pela substituição de hidrogénio por oxidrilos nos dois anéis aromáticos.

Com efeito, se um átomo de hidrogénio é substituído por um oxidrilo, principalmente na posição 3, obtém-se os compostos com a designação geral de flavonóis (FERRÃO, 1963).



Se porventura se suprime a dupla ligação entre o átomo de carbono 2 e 3 das flavonas, obtemos a estrutura básica das flavanonas (SESHADRI, 1962; FERRÃO, 1963),



obtendo-se igualmente os flavanonóis pela supressão da dupla ligação entre o átomo de carbono 2 e 3 dos flavonóis.

a) — **Propriedades**

Ocorrem estes compostos na natureza geralmente sob a forma de heterósidos, isto é, ligados a açúcares e, mais raramente, no estado livre, agluconas (COSTA, 1967).

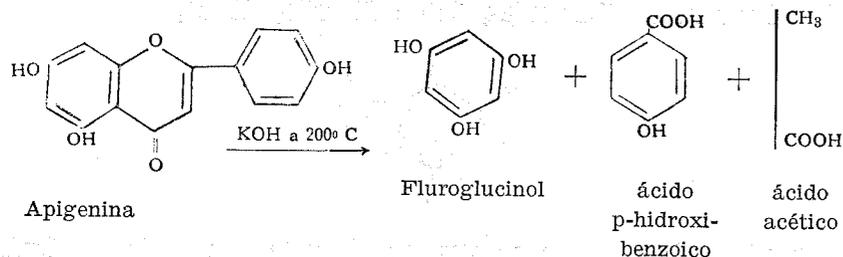
Neste estado formam cristais amarelos, em que o poder cromóforo se relaciona com o número e posição dos hidróxilos, ou formam cristais incolores embora excepcionalmente, como no caso da flavona.

As suas solubilidades são variáveis. Solubilizam-se no etanol e metanol de onde se podem cristalizar pelos álcalis, ácido acético, piridina, etc., e são geralmente insolúveis ou pouco solúveis no éter, benzeno, sulfureto de carbono, clorofórmio, etc. (COSTA, 1967).

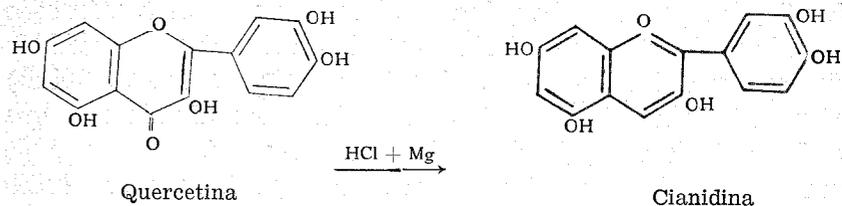
No estado heterosídico apresentam maiores solubilidades na água mesmo a frio, e nos alcoóis diluídos, não sendo insolúveis nos solventes orgânicos usuais não miscíveis na água (COSTA, 1967).

Estes compostos, quando hidroxilados, reagem a frio com os álcalis, resultando fenatos solúveis na água, por vezes corados, mas decomponíveis pelos ácidos, podendo fragmentarem as suas moléculas por aquecimento, mesmo em soluções diluídas (COSTA, 1967).

Sofrem degradação da molécula por fusão alcalina, quando se aquece a substância a cerca de 200° C com o hidróxido de potássio e algumas gotas de água. Os produtos formados extraem-se por éter e, depois, agitando esta solução etérea com uma solução de bicarbonato de sódio, os constituintes degradados repartem-se. Na fase aquosa aparecem os constituintes fenólicos, o que permite fazer o estudo das respectivas estruturas moleculares.



Sofrem redução pelo hidrogénio dando compostos avermelhados antociânicos. Para que tal redução se desenvolva adiciona-se à solução alcoólica do composto, que contém um pequeno fragmento de magnésio, um pouco de ácido clorídrico. O resultado é contudo negativo para as isoflavonas.



Em meio anidro, as soluções cetónicas adquirem tons amarelados e fluorescências amarelo-esverdeadas com o ácido cítrico e bórico dissolvido em acetona. Porém, este ensaio é negativo para as flavanonas e isoflavonas. Com o ácido sulfúrico concentrado formam-se sais de oxónio e as soluções apresentam fluorescências amarelas. Pela adição de água, reprecipitam apresentando comportamento idêntico com o pentacloreto de antimónio. Apresentam reacções características devidas aos hidróxidos fenólicos. Com os hidróxilos alcalinos coloram-se de tons amarelos, adquirindo cor vermelha uma vez oxidados com água oxigenada em meio alcalino.

Têm propriedades redutoras que são reveladas por colorações diversas com os reagentes fosfotungstomolibdico, ferricianeto férrico, nitrato de prata amoniacal, etc., formando complexos com os sais metálicos e dando colorações diversas em soluções alcoólicas com o cloreto férrico e acetato de magnésio.

b) — **Extracção**

Usualmente as flavonas extraem-se a partir do material vegetal fresco quer pelo etanol a 70 % em volume, etanol a 95 %, metanol ou água (HARBORNE, 1960), mergulhando o material vegetal no solvente fervente, reduzindo assim a hidrólise enzimática dos glucósidos a um mínimo.

Uma vez assim obtido o extracto é em seguida lavado em éter de petróleo removendo-se a clorofila que é causa de lis-

tramentos dos cromatogramas. Filtra-se e concentra-se até pequeno volume no vácuo.

O concentrado assim obtido filtra-se novamente podendo depois ser aplicado com micropipetas no suporte de cromatografia.

No caso das uvas, procede-se primeiramente à separação, à mão, das películas da polpa. Obtidas estas faz-se a extracção usando várias tomas de ácido clorídrico a 1 %, tendo o cuidado de operar à temperatura ambiente (RIBÉREAU-GAYON, 1964b) visto a hidrólise ácida destes compostos ser mais fácil do que a das antocianinas, justificando-se ao mesmo tempo o uso de um solvente ácido por se pretender a neutralização das bases que existem em abundância nas películas das uvas.

A partir desta solução procede-se à extracção dos flavonóis com acetato de etilo (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964a, 1964b) concentrando-se o extracto no vácuo pela utilização de um evaporador rotativo e redissolve-se o resíduo nalgumas gotas de álcool a 95° em volume (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964a), ou de acetato de etilo.

RIBÉREAU-GAYON utiliza procedimentos diferentes para a extracção das agluconas flavonóis, conforme haja presença ou ausência de antocianinas (P. RIBÉREAU-GAYON, 1968a). Assim na ausência de antocianinas este autor faz uma única extracção com álcool isoamílico o que lhe permite a extracção de todos os compostos polifenólicos presentes. Verificando-se a existência de antocianinas extrai primeiramente todos os outros compostos, salvo as antocianinas, com éter etílico e, posteriormente, as antocianinas com álcool isoamílico, cumprindo neste caso estudar dois extractos. Obtidos os extractos, procede-se ao estudo dos seus constituintes para o que é necessário purificá-los, isolá-los e identificá-los. Para esse efeito é eficientemente utilizada a técnica de cromatografia, referida e desenvolvidamente praticada entre outros por STRAIN (1945), LIMA (1956), FERNANDES (1958), SMITH (1960), STAHL (1965), RANDEATH (1966), havendo já actualmente uma grande variedade de eluentes e de suportes, sendo oportuno referir os de utilização mais frequente.

### c) — Eluentes

Um eluente de grande utilização é o «Forestal» (ácido acético, água, ácido clorídrico concentrado 30 + 10 + 3 em volume) que teve o seu emprego inicial unicamente no estudo das antocianinas, sendo hoje a sua aplicação corrente, com bons resultados no estudo das agluconas flavónicas. RIBÉREAU-GAYON (1968a), em experiências por ele efectuadas, utilizou-o bem como o butanol acético (fase superior da mistura n-butanol, ácido acético, água 4 + 1 + 5 em volume), no estudo dos compostos considerados pela cromatografia bidimensional, atribuindo um particular relevo ao butanol acético, como o mais importante eluente no estudo das flavonas por ser igualmente válido para o estudo das agluconas e dos heterósidos.

Quando se iniciou o emprego deste último eluente, utilizava-se apenas a fase superior da mistura n-butanol, ácido acético, água (4 + 1 + 5 em volume) obtida por decantação. Todavia é possível simplificar a sua preparação a partir da mistura (6 + 1 + 2 em volume) a qual conduz à formação duma fase única, havendo porém tomar a precaução de não a conservar durante muitas semanas, pois as consequentes esterificações vão influir nos valores de Rf.

É ainda RIBÉREAU-GAYON (1968a) quem indica o ácido acético de concentração compreendida entre 2 e 15 %, como eluente de boa utilização no estudo dos heterósidos. Verificou uma variação dos Rf em acordo com a concentração maior ou menor deste ácido.

O eluente m-cresol proposto por BATE-SMITH de constituição m-cresol, ácido acético, água (50 + 2 + 48 em volume), e indicado por RIBÉREAU-GAYON, apresenta como interesse mais saliente o facto de dar para os heterósidos valores de Rf diferentes dos conseguidos através do butanol-acético, efeito este que é igualmente conseguido com o ácido acético diluído. Dá-se porém preferência a este último eluente visto que com o m-cresol os constituintes do extracto nem sempre se separam sob a forma de manchas, sendo igualmente difícil a sua eliminação quando se pretende a purificação das substâncias.

A utilização pura e simples da água é proposta por HARBORNE (1960), visto ser ela não só um bom eluente para os glucósidos dos flavonóis mas também permite que se separem

as agluconas flavonas e flavonois dado que estas não se movendo na água se separam das agluconas flavanonas.

Defende ainda este autor o emprego do ácido acético a 2% e do cloreto de sódio a 3% e dado que fortes misturas de ácido acético com água favorecem a separação da flavona e aglucona flavonol, propõe também os eluentes aquosos «Forestal», o ácido acético a 30% e o ácido acético a 60%.

Entre os eluentes alcoólicos é ainda HARBORNE quem aconselha o atrás citado butanol acético (fase superior da mistura n-butanol, ácido acético, água, 4 + 1 + 5 em volume) que designa por «BAW», bem como a fase superior da mistura n-butanol-água (1 + 1 em volume), e o n-propanol-ácido acético-água (1 + 1 + 1 em volume).

Como eluentes fenólicos indica o fenol ou o m-cresol saturado de água, o m-cresol-ácido acético-água (50 + 2 + 48 em volume), e a mistura benzeno-ligroina com a temperatura de ebulição de 85° a 105°-metanol-água (50 + 50 + 1 + 50 em volume) que determina correctas separações para os flavonois que contenham de um a três grupos hidroxilados. Como eluentes triclorometânicos indica as misturas de clorofórmio-álcool isopropílico-água, clorofórmio e acetato de etilo saturados de água que possuem contudo o inconveniente de provocar listramentos do cromatograma.

É nesta já bem diversificada gama de eluentes que surgem soluções aquosas de clorofórmio ou benzeno com ácido acético, butanol e etanol com um tampão de borato ou ainda sec-butanol saturado de água. Assim EGGER (1961) conseguiu bons resultados nas separações dos glucósidos e misturas de miricetina, quercetina e campferol com o eluente clorofórmio-ácido acético-água obtido por mistura de clorofórmio e ácido acético nas proporções variáveis de 1 + 2 a 2 + 1 a que adicionou seguidamente água.

Por sua vez WONG & TAYLOR (1962) utilizaram para o estudo das agluconas flavónicas o eluente benzeno-ácido acético-água (125 + 72 + 3 em volume) servindo igualmente como complemento dos eluentes alifáticos.

COULSON & EVANS (1958) empregaram o eluente n-butanol-etanol-tampão borato (1 + 1 + 1 em volume) no estudo dos glucósidos e das agluconas, podendo ser o tampão tanto a solução de tetraborato de sódio a 9,54 g/l como o borato

Consden, variando porém os valores de Rf conforme o borato utilizado. ROUX & EVELYN (1958) empregaram o sec-butanol saturado de água, concluindo igualmente como já o tinha feito HARBORNE, que os flavonois não se deslocam do ponto de partida utilizando o eluente água.

Mais recentemente BOURZEIX & BANIOL (1966) usaram na cromatografia bidimensional a fase inferior da mistura álcool isoamílico-ácido acético-hexano-água (3 + 1 + 3 + 3 em volume), como primeiro eluente e a fase superior da mistura álcool amílico terciário e água (1 + 1 em volume) como segundo eluente, no estudo dos flavonois, eluentes esses que nos mereceram a maior atenção no decurso deste trabalho.

#### d) — Suportes

Como já referimos, na técnica de cromatografia desempenham uma importância muito particular os suportes que possam vir a ser usados já que o comportamento das substâncias a analisar oferece variações significativas facultando estudos diferenciados das mesmas substâncias e por consequência um estudo comparativo e crítico do seu desenvolvimento. Todavia o suporte a empregar está dependente do tipo de cromatografia utilizada. Tratando-se de cromatografia em papel o suporte mais vulgarizado é o papel Whatman N.º 1 (RIBÉREAU-GAYON, 1964b; HARBORNE, 1960; ROUX & EVELYN, 1958; WONG & TAYLOR, 1962) tendo uso frequente papéis mais espessos como o Whatman N.º 4, o Whatman N.º 3 ou o 3MM (HARBORNE, 1960) que garantem um isolamento mais perfeito e uma purificação mais completa. Os papéis tamponizados com borato ou fosfato têm também aqui o seu emprego havendo que referir o valor do pH visto estar o seu valor relacionado com as variações do Rf.

Tratando-se da cromatografia em camada fina recorre-se a suportes como a poliamida Woelm (BHANDARI, 1964), pó de celulose Macherey e Naegel (M. N. 300) e pó de celulose Serva (T. L. C.) (BOURZEIX & BANIOL, 1966) ou ao pó de celulose Whatman CC41 (ESTEVEZ-PINTO, 1969) e ainda aos suportes de poliamida Sephadex G-25 ou Sephadex LH-20 (JOHNSTON *et al.*, 1968) se se utilizar a cromatografia em coluna como recurso no estudo destes compostos.

e) — Identificação

Uma vez isolados e purificados por cromatografia os compostos em causa, procedemos à sua identificação. Para tal efeito recorremos a vários procedimentos entre os quais poderemos

QUADRO I

Agluconas das Flavonas e dos Flavonois	Substituintes	Valor de Rf para os eluentes			Cores ao ultra-violeta
		«BAW»	«FORESTAL»	«FENOL»	
<b>Flavonas</b>					
Acacetina ....	5,7-diOH,4'-OMe	0,91	0,91	0,88	castanha- -escura
Apigenina ....	5,7,4'-triOH	0,89	0,83	0,88	castanha- -escura***
Diosmetina ...	5,7,3'-triOH,4'-OMe	0,85	0,80	0,86	castanha- -escura
Luteolina .....	5,7,3',4'-tetraOH	0,78	0,66	0,66	castanha- -escura***
Tricina .....	5,7,4'-triOH,3',5'-diOMe	0,73	0,72	0,87	castanha- -escura***
Saponaretina.	5,7,4'-triOH,8-subst.*	0,56	0,86	0,80	castanha- -escura***
Vitexina .....	5,7,4'-triOH,8-subst.**	0,43	0,82	0,63	castanha- -escura***
<b>Flavonois</b>					
Campferol ....	3,5,7,4'-tetraOH	0,83	0,85	0,58	amarela- -esverdeada
Morina .....	3,5,7,2',4'-pentaOH	0,79	0,73	0,34	amarela
Isoramnetina.	3,5,7,4'-tetraOH,3'-OMe	0,74	0,53	0,66	amarela
				0,32	amarela-
Fisetina .....	3,7,3',4'-tetraOH	0,73	0,58		-esverd. fl.
Ramnetina ...	3,5,3',4'-tetraOH,7-OMe	0,72	0,53	0,66	amarela
Quercetina ...	3,5,7,3',4'-pentaOH	0,64	0,41	0,29	amarela
Azaleatina ...	3,7,3',4'-tetraOH,5-OMe	0,48	0,49	0,50	amarela fl.
Miricetina ....	3,5,7,3',4',5'-hexaOH	0,43	0,28	0,13	amarela- -doirada
Robinetina ...	3,7,3',4',5'-pentaOH	0,40	0,36	0,18	amarela- -esverd. fl.

\* (CHOH)5.CH<sub>2</sub>OH

\*\* CHOH.CH.CHOH.CH.CH<sub>2</sub>OH

| — O — |

\*\*\* Estas flavonas tornam-se verde-brilhante ou verde-amarelada quando expostas aos vapores de amónia. As outras não se alteram.

citar a determinação da estrutura molecular, comparação do seu comportamento cromatográfico com o de substâncias puras (padrões) ou ainda o recurso a determinados índices dos quais o Rf é um exemplo.

Limitar-nos-emos, por nos parecer mais útil, apresentar os Quadros I e II com os valores de Rf correspondentes aos vários eluentes, assim como as respectivas cores quando irradiados por ultravioletas em cromatografia de papel, estu-

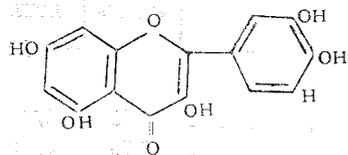
QUADRO II

Glucósidos dos flavonois	Valores do Rf nos eluentes			
	«BAW»	ÁGUA	Ácido acético a 15%	FENOL
<b>Campferol</b>				
3-monoglucósido . . . . .	0,70	0,13	0,43	0,74
3-ramnoglucósido . . . . .	0,54	0,23	0,54	0,64
3-diglucósido . . . . .	0,43	0,27	0,54	0,55
3-triglucósido . . . . .	0,31	0,33	0,51	0,45
3-ramnodiglucósido . . . . .	0,41	0,34	0,61	0,54
3-ramnogalactósido-7-ramnósido .	0,40	0,54	0,75	0,73
3-ramnodiglucósido-7(?)glucósido	0,40	0,54	0,74	0,52
7-monoglucósido . . . . .	0,54	0,02	0,17	0,62
7-monoramnósido . . . . .	0,75	0,02	0,18	0,72
3-xiloglucósido . . . . .	0,55	0,29	0,65	0,68
<b>Quercetina</b>				
3-monoarabinósido . . . . .	0,70	0,07	0,31	0,61
3-monoxilósido . . . . .	0,65	0,06	0,32	—
3-monoglucósido (isoquercitrina).	0,58	0,08	0,37	0,54
3-monogalactósido . . . . .	0,55	0,09	0,35	0,56
3-monoramnósido (quercitrina) .	0,72	0,19	0,49	0,58
3-ramnoglucósido (rutina) . . .	0,45	0,23	0,51	0,46
3-diglucósido . . . . .	0,37	0,19	0,45	0,36
3-triglucósido . . . . .	0,23	0,18	0,41	0,26
3-ramnodiglucósido . . . . .	0,36	0,26	0,54	0,35
3-ramnoglucósido-7(?)glucósido .	0,36	0,46	0,71	0,31
7-monoglucósido . . . . .	0,37	0,00	0,07	0,40
4'-monoglucósido . . . . .	0,48	0,01	0,13	0,33
3,4'-diglucósido-3-metil éter . .	0,38	0,27	0,62	0,63
<b>Miricetina</b>				
3-monoglucósio . . . . .	0,47	0,05	0,25	0,32
3-monoramnósido . . . . .	0,60	0,15	0,44	0,39

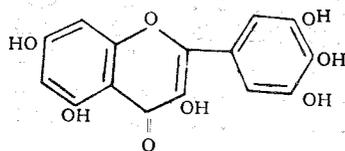
dadas por HARBORNE, valores esses particularmente importantes para a identificação das substâncias aqui consideradas.

f) — Os flavonóis na uva e no vinho

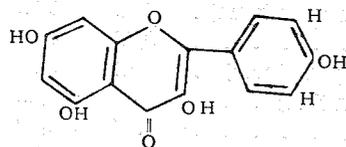
Examinemos agora os flavonóis. O seu valor quantitativo deverá influir nas propriedades organolépticas dum vinho. No caso vertente, por se tratar dum vinho tinto, existem além dos heterosidos as agluconas flavonóis quercetina, miricetina e campferol (RIBÉREAU-GAYON, P. ?) cujas formas estruturais são as seguintes:



Quercetina



Miricetina



Campferol

Contudo, é sob a forma glucosídica que estes compostos se encontram na uva, tendo RIBÉREAU-GAYON identificado (RIBÉREAU-GAYON, 1964a) nas uvas tintas quatro pigmentos glucosídicos e três deles nas uvas brancas, por ser ausente o glucosido da miricetina.

Reproduzimos nos Quadros III e IV, de assinalável interesse, algumas características e teores (RIBÉREAU-GAYON, 1964a, 1964b) destes glucosidos, nas películas das uvas.

QUADRO III

Valor de Rf nos eluentes		Fluorescência ao U. V. com NH <sub>3</sub>	Identificação
Butanol acético	Ác. acético a 15%		
0,69	0,54	amarela-esverdeada	Campferol-3-monoglucósido
0,57	0,41	amarela	Quercetina-3-monoglucósido
0,50	0,32	amarela-dourada	Miricetina-3-monoglucósido
0,50	0,42	amarela	Quercetina-3-monoglucuronósido

QUADRO IV

Pigmentos flavónicos identificados na película da uva	Teores (%)	
	Uvas tintas	Uvas brancas
Campferol-3-monoglucósido . . . . .	5	10
Quercetina-3-monoglucósido . . . . .	50	55
Miricetina-3-monoglucósido . . . . .	15	0
Quercetina-3-monoglucuronósido . . . . .	30	35

A existência na uva unicamente de pigmentos glucosídicos flavonóis e no vinho de glucosidos e agluconas simultâneamente, deve-se ao facto, já atrás citado, de se dar a hidrólise ácida, originando-se as respectivas agluconas.

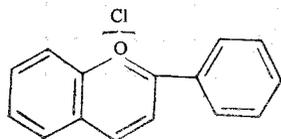
É esta presença de agluconas flavonóis no vinho e o respectivo comportamento no decorrer do envelhecimento um dos aspectos merecedor da maior atenção no desenvolver deste trabalho.

#### 4 — COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS

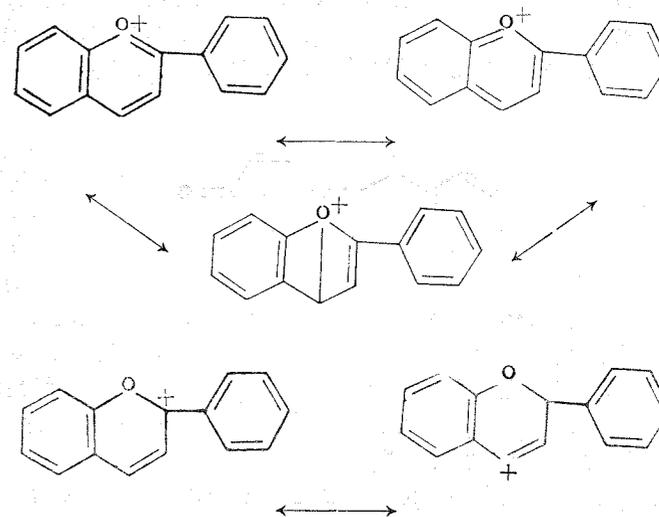
O termo antociana derivado das palavras gregas «anthos» (flor) e «Kyanos» (azul), designa os pigmentos responsáveis pelas colorações vermelha e azul mais difundidas no reino vegetal, sem precisar se o pigmento tem ou não carácter heterosídico.

É todavia no estado heterosídico que as antocianas vulgarmente existem na natureza, ligando-se os radicais de açúcar geralmente na posição 3 e, mais raramente na posição 5, podendo no entanto estarem ligados nas duas posições. Sob esta forma, em que os açúcares mais correntes são a glucose, galactose, ramnose, pentose e xilose, as antocianas são designadas, por antocianinas ou ainda antocianinas aciladas, se estiverem ligadas a ácidos orgânicos, normalmente ao ácido p-cumárico. Mais raramente estes pigmentos encontram-se na natureza no estado livre (aglucona) e recebem a designação de antocianidinas.

Quimicamente as antocianas são derivados hidroxilados e metilados do 2-fenil-benzopirílio (ião flavílio) que apresentam uma estrutura iónica geralmente representável em meio ácido sob a forma de cloreto,



em que a chaveta colocada sob o cloretião, indica a natureza iónica não localizada desta ligação. A sua aceitação justifica-se unicamente pela sua simplicidade, não pelo seu rigor, pois implicaria a localização da carga positiva exclusivamente sobre o átomo de oxigénio o que não é exacto. De facto a carga positiva pode estar situada sobre o átomo de oxigénio, formando um ião oxónio, ou sobre um átomo de carbono dando um ião carbónico ou ainda ficar localizada sobre qualquer substituinte. A fórmula seria melhor representada como estado de ressonância em que todas estas estruturas interviriam, e talvez mais algumas, sem que se saiba quais são as formas privilegiadas.

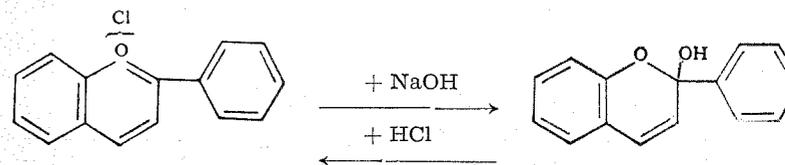


Todavia, como medida de simplificação, representa-se a sua estrutura como a de um sal de oxónio (RIBÉREAU-GAYON, 1963).

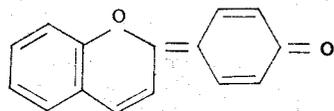
##### a) — Propriedades das antocianas

Manifestam as antocianas propriedades anfotéricas (COSTA, 1967), formando com os ácidos sais de oxónio corados de vermelho e, com as bases, sais cor de violeta ou azuis, sendo considerados como indicadores orgânicos.

Esta coloração vermelha, em meio ácido, vai perdendo a intensidade com o aumento do valor de pH. Pode reaparecer integralmente por acidificação, pelo menos no caso das antocianinas, por existir em equilíbrio com uma forma incolor denominada pseudobase.

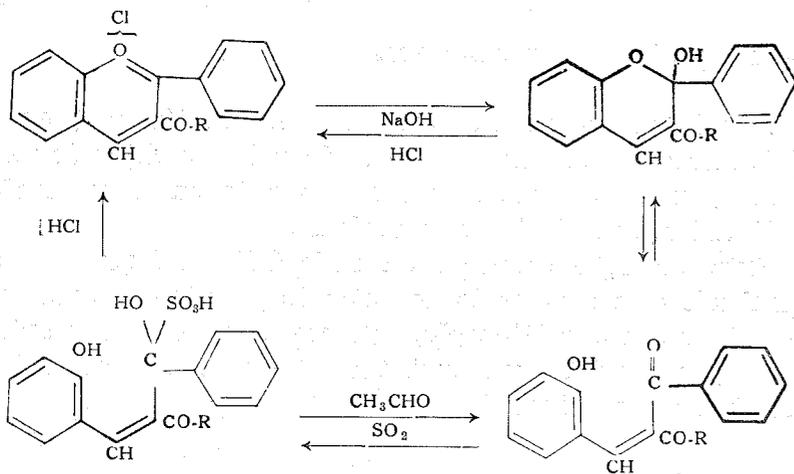


No meio neutro ou alcalino a coloração como foi dito passa a azul que corresponde a uma forma de estrutura quinóide (ALMEIDA, 1960; RIBÉREAU-GAYON, 1963),



sendo verde em meio fortemente alcalino. A reversibilidade desta última estrutura mantém-se, desde que não se trate de antocianidinas, muito instáveis, ou de pigmentos possuidores de dois oxidrilos em posição orto, muito oxidáveis em meio alcalino (RIBÉREAU-GAYON, 1963).

Outra propriedade importante é a de descolorarem por acção do anidrido sulfuroso, propriedade essa que sendo nítida perto de pH 3 é fraca a pH 1 (HCl a 1%) e deixa de se verificar em meio muito mais ácido (HCl a 1/2). Conclui-se ser a pseudobase que reage com o anidrido sulfuroso,



admitindo tratar-se duma reacção de adição.

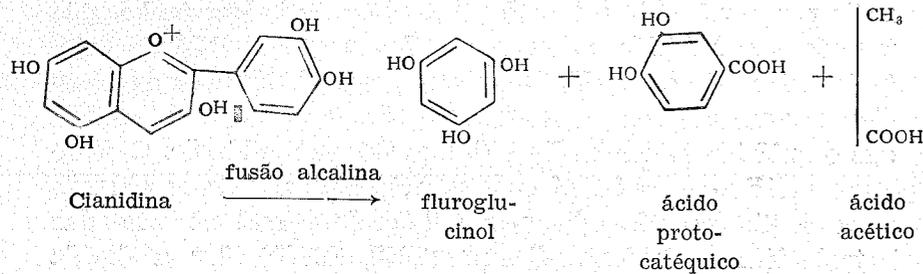
A reversibilidade do fenómeno, em particular na recoloração pela adição dum excesso de etanal ou ainda na reapaa-

rição progressiva da coloração num vinho tinto que tenha sido tratado por anidrido sulfuroso explica-se pelo equilíbrio existente entre este e o anidrido sulfuroso combinado com as antocianinas, verificando-se a dissociação da combinação à medida que o anidrido sulfuroso livre desaparece por oxidação. O fenómeno verifica-se porém só com as antocianinas, não se obtendo regeneração da coloração com adição de etanal no caso das antocianidinas. RIBÉREAU-GAYON (1963, 1964b) deu a devida importância ao facto e investigou qual o átomo de carbono responsável pela descoloração, admitindo que pertencesse ao heterociclo central. Desprezou pois a possibilidade de se verificar tal efeito no átomo de carbono 4 incapaz de reagir, bem como no átomo de carbono 3, pois muito embora possua um oxidrilo enólico, teoricamente susceptível de reagir sob a forma de cetona e fixar o anidrido sulfuroso, tal não se verifica, por se encontrar bloqueado por uma molécula de açúcar no caso das antocianinas. Por exclusão, pelo menos no caso destes heterosidos, fica unicamente o átomo de carbono 2 com possibilidade de fixar o anidrido sulfuroso (RIBÉREAU-GAYON, 1963).

As antocianinas formam complexos com sais metálicos em particular com os de ferro e alumínio. Possuindo dois óxidrilos em posição orto os complexos assumem uma nítida coloração azul.

A redução das antocianinas, de mecanismo ainda desconhecido, provoca o desaparecimento da cor, verificando-se a supressão da ligação conjugada existente entre os dois ciclos benzénicos, o que leva a considerar o fenómeno como uma redução da dupla ligação do heterociclo central (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).

Por fusão alcalina das antocianinas origina-se ácido acético, um ácido aromático e um fenol ou éter fenólico, devido à destruição da sua estrutura molecular (COSTA, 1967), propriedade esta, de grande interesse, pois pode servir de recurso para a sua identificação. Com efeito a cianidina, por exemplo, verificamos que por fusão origina o ácido protocatéquico. A delfinidina e petunidina originam em idênticas condições respectivamente os ácidos gálgico e metil-gálgico (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).

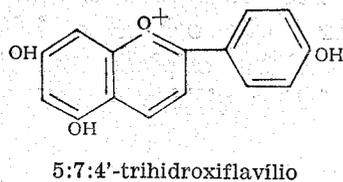


Contudo, como assinalámos, estes compostos combinam-se com os ácidos originando cristais de sais de oxónio, corados e diversamente solúveis na água e no álcool, sendo sobre a forma de cloreto que as suas propriedades se manifestam, convindo notar que os heterósidos se dissolvem na água, mas são menos solúveis no metanol, etanol e álcool amílico, contrastando com os sais de oxónio geralmente pouco solúveis na água e melhor solúveis no metanol e etanol (COSTA, 1967). Reagem ambos com o ácido sulfúrico concentrado dando origem a uma coloração laranja-amarelada. Com o hidróxido de sódio em solução aquosa dão uma coloração variando do azul ao violeta e com o magnésio-ácido clorídrico uma coloração variando de vermelha desmaiada a cravo pálido, colorações estas que nos permitem em certa medida identificá-las dos outros compostos flavonoides (FERRÃO, 1963).

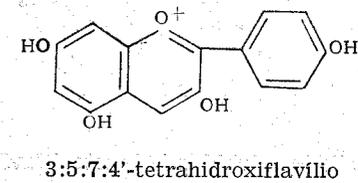
**b) — Antocianidinas**

As antocianidinas, ou agluconas das antocianinas, encontram-se raramente no estado livre no reino vegetal, obtendo-se porém facilmente por hidrólise ácida à temperatura de ebulição. O seu número é bastante limitado convindo assinalar as mais correntes na natureza.

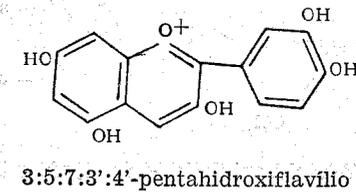
*Apigenidina* ou *gesneridina*, que sendo de todas a mais simples, não tem oxidrilo na posição 3.



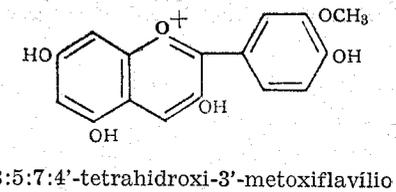
*Pelargonidina*



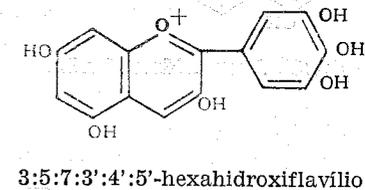
*Cianidina*



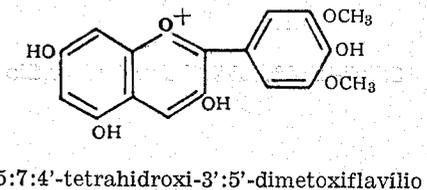
*Peonidina*



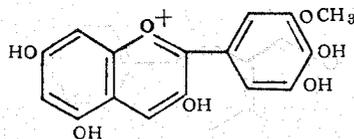
*Delfinidina*



*Malvidina*

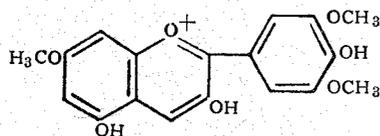


*Petunidina*



3:5:7:4':5'-pentahidroxi-3'-metoxiflavílio

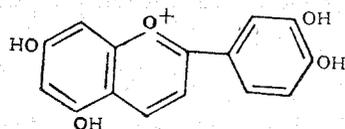
*Hirsutidina*



3:5:4'-trihidroxi-7:3':5'-trimetoxiflavílio

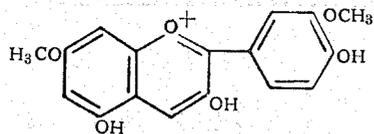
Tendo sido detectadas muito embora em menores quantidades a luteolinidina e a rosinidina de formas de estrutura respectivamente:

*Luteolinidina*



5:7:3':4'-tetrahidroxiflavílio

*Rosinidina*



3:5:4'-trihidroxi-7:3'-dimetoxiflavílio

No vinho, não foram até hoje encontradas antocianidinas no estado livre. Pela sua hidrólise ácida unicamente foram detectadas a cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina das quais a cianidina, malvidina e delphinidina assumem maior relevo (RIBÉREAU-GAYON, 1964b) e, provavelmente, maior influência na pigmentação dos vinhos tintos.

c) — Antocianas na uva e no vinho e a sua evolução

Mau grado a sua complexa repartição, são as antocianas os pigmentos responsáveis pela cor vermelha. P. RIBÉREAU-GAYON (1968b) identificou dezassete dessas substâncias que são monoglucósidos, diglucósidos e heterósidos acilados (nos quais está fixado um radical de ácido cinâmico, mais geralmente o do p-cumárico), que como atrás assinalámos originam por hidrólise ácida cinco antocianidinas diferentes, assumindo particular relevância quantitativa na uva, a malvidina (1968b).

Vem a propósito tratar da presença de diglucósidos cujo interesse reside em poder eventualmente revelar se dado vinho foi fabricado no todo ou em parte, partindo de uvas tintas de produtores directos. Com efeito esta presença de diglucósidos é específica de algumas espécies do género *Vitis* (*V. riparia* e *V. rupestris*) e ausente na *V. vinifera* (BIOL & FOULONNEAU, 1961; BIOL & MICHEL, 1961c) o que originou estudos vários de distinção destas castas pela detecção de tais compostos (DEIBNER, 1964 & *al.*, 1964; DEIBNER & BOURZEIX, 1965; DORIER & VERELLE, 1966; LEFÈVRE, 1966), chegando mesmo a descrever-se um protocolo preciso (JAULMES & NEY, 1960) da pesquisa de híbridos de castas americanas no vinho tinto, assunto de elevado interesse dado a suposta toxicidade de tais pigmentos.

É de notar, porém, que o carácter «presença de diglucósidos» se transmite segundo as leis da genética como factor dominante (BOUBALS *et al.*, 1962; RIBÉREAU-GAYON, 1968b), o que significa que um cruzamento entre uma *Vitis vinifera* e uma espécie americana (*V. riparia*, *V. rupestris*) conduz a uma população híbrida de primeira geração possuindo todos os indivíduos diglucósidos. Pode, porém, aparecer o carácter «ausência de diglucósidos» da *V. vinifera*, quando, por exemplo, se faz novo cruzamento entre um híbrido da primeira geração

e a *V. vinifera*, conclusão esta que nega a possibilidade de em todos os casos serem diferenciados os vinhos, quanto à pureza das castas que lhes deram origem, através duma análise da sua matéria corante (BIOL & FOULONNEAU, 1961; BIOL & MICHEL, 1961a, 1961c; RIBÉREAU-GAYON, 1964b; DEIBNER & BOURZEIX, 1965; DORIER & VERELLE, 1966; LEFÈVRE, 1966).

O aparecimento das antocianinas verifica-se quando da pigmentação do bago da uva e é função de vários factores fisiológicos e climáticos sofrendo o seu valor quantitativo, de ano para ano, diferenças notáveis devidas nomeadamente à iluminação, insolação, chuva e rega. Com efeito no dizer de PASCAL RIBÉREAU-GAYON o seu valor diminui quando por exemplo falta água ou haja deficiente iluminação e insolação.

Com o amadurecimento do bago de uva verifica-se um aumento da sua pigmentação que atinge o máximo na altura da maturação, traduzindo-se num aumento do valor quantitativo do complexo antociânico, tudo se passando como se fosse um fenómeno linear, função do tempo, verificando-se com a sobrematuração uma diminuição do seu valor como o assinalou P. RIBÉREAU-GAYON.

Convém porém referir a existência duma relação constante entre os diferentes pigmentos na mesma cepa, relação esta que é independente da acção exercida sobre a planta pelos factores climáticos. No vinho por sua vez a riqueza antociânica vai baixando com o tempo notando-se um decréscimo acentuado nos primeiros anos, devido talvez a uma condensação das moléculas que, passando progressivamente ao estado coloidal, se tornam insolúveis.

As antocianinas, uma vez insolúveis, precipitam, passando os taninos a desempenhar um papel preferencial na coloração dos vinhos velhos no dizer deste autor.

#### d) — Extracção e purificação das antocianinas

A extracção das antocianinas a partir dum tecido vegetal e sua consequente purificação, tendo em vista obter bons resultados analíticos, é ainda hoje um trabalho delicado e fastidioso em que têm de ser respeitados certos preceitos, antes mesmo de ser dado início à extracção.

Os diversos enzimas podem ser causa de fenómenos perturbadores conduzindo a alterações. Para as evitar, recorre-se à congelação rápida do material vegetal após colheita, o que permite conservá-lo durante um tempo considerável a temperaturas entre  $-20^{\circ}$  e  $-30^{\circ}$  C, temperaturas estas, em que a actividade enzimática é praticamente nula. Tal preceito porém, tem o inconveniente de fazer reaparecer tal actividade após o degelo, quando se tem em vista a extracção.

PUISSANT & LÉON (1965) e RIBÉREAU-GAYON (1968a) extraíram as antocianinas com uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1 % mediante sucessivas extracções, tendo o segundo (RIBÉREAU-GAYON, 1968a) demonstrado ao mesmo tempo a constância da proporcionalidade das respectivas proporções mútuas, independentemente da ordem pela qual são executadas as operações.

HARBORNE (1958) utilizou o metanol e o etanol, por vezes com vantagem, pois são facilmente eliminados por evaporação, tornando fácil a concentração. Tal processo, principalmente utilizado quando os extractos das plantas contêm pequenas quantidades de antocianinas, não deve ser levado até à secura, por poder tornar difícil a sua redissolução.

Todo o processo de extracção deverá ser feito em meio ácido, pois, como já foi assinalado, as antocianinas são instáveis em meio neutro e alcalino (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).

É recomendável o emprego da água quando haja em vista o fraccionamento da solução. Para tal procede-se a uma nova extracção, mas agora líquido/líquido usando, por exemplo, acetato de etilo ou éter, processo conveniente para as antocianinas, hidrolizadas ou não (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).

Contudo, nem todos os autores dão a preferência aos solventes de extracção atrás citados. Com efeito BAYER (1959) utilizou o ácido clorídrico 5N a frio, durante oito horas, com agitação ocasional e MATHERS (1951), o fenol, piridina, isopropil, ou alcoóis superiores, que podem ser evaporados para concentração da cor, ou absorvida numa coluna de sílica gel após adição de benzeno, para o mesmo efeito.

A extracção é delicada, e assim a considerou SESHADRI (1962), que utilizou procedimento diferente, consoante o material utilizado, folhas, flores e outros órgãos vegetais, para obter as antocianinas no estado cristalino.

Obtido o extracto, procede-se à sua purificação. Trata-se este com éter de petróleo (HARBORNE, 1958) que, formando fase com o solvente das antocianinas, remove a clorofila e mais impurezas sempre prejudiciais à finalidade da operação, e ainda, como SWAIN e NORSDRÖM, citados por RIBÉREAU-GAYON (1968a), o carvão animal a fim de eliminar os açúcares que correntemente existem nos vegetais.

É a altura de referir a técnica de KOZŌ HAYASHI (1962) citada num trabalho de FERRÃO (1963). Aquele autor faz a extracção com uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1 % diferindo o procedimento conforme se trata de diglucósidos, monoglucósidos ou antocianidinas.

Após extracção dos diglucósidos, sofre o líquido obtido lavagens sucessivas com álcool amílico. As antocianinas são transferidas do extracto bruto para uma mistura constituída por duas partes de álcool amílico e uma de acetofenona com ácido pícrico. Os pigmentos são então passados para uma solução de ácido clorídrico a 1 % pela adição de éter. O ácido pícrico é removido por extracções sucessivas com éter.

Os monoglucósidos são purificados pela extracção com cicloexanona ou acetato de etilo, contendo ambos ácidos pícrico. A camada orgânica é tratada com éter de petróleo, extraem-se os monoglucósidos com ácido clorídrico a 1 % e lava-se finalmente o extracto com cicloexanona e benzeno.

As antocianidinas são extraídas pelo álcool amílico, seguindo-se lavagem com ácido clorídrico a 1 % e adição dum excesso de benzeno à solução alcoólica e recolha das antocianidinas numa pequena porção de ácido clorídrico a 1 %. Extrair novamente com álcool amílico, repetindo o processo se necessário. A solução final é libertada do álcool amílico por lavagem com benzeno.

DEIBNER (1963), por sua vez, tendo em vista o isolamento destes compostos, precipita as antocianinas do vinho com acetato de chumbo. Assim, precipita os monoglucósidos na ausência de amoníaco e os diglucósidos recorrendo ao acetato de chumbo amoniacal (pH 10-11), sofrendo a este pH os monoglucósidos e agluconas modificações sensíveis e, por vezes até, destruição. Após este tratamento recorre à cromatografia de partição em papel para subsequente isolamento das antocianinas. Esta técnica de cromatografia foi igualmente utilizada por

ASEN (1965) com vista à purificação das antocianinas e por BATE-SMITH (1963), tratando a solução aquosa com volume igual de n-propanol, que sendo inteiramente miscível na água saturou com cloreto de sódio formando-se então duas fases em que a fase superior constituída por n-propanol contém a totalidade ou pelo menos uma fracção representativa dos heterósidos polifenólicos que interessa estudar.

Contudo, convém salientar que nesta purificação é possível recorrer a resinas permutadoras de iões, tal como SEIKEL (1962), que utilizou a Amberlite IRC-50 na forma ácida, assinalando igualmente a utilização da Duolite Cation Selector, CS-100, Dowex I-XI, Amberlite 45 e Amberlite IR-4B. Todavia, achámos conveniente referir também os eluentes e suportes mais comuns utilizados nesta técnica conducentes a ser satisfeita a finalidade do nosso trabalho.

#### e) — Eluentes

As antocianinas possuem carácter iónico, garantia de grande estabilidade a baixos valores de pH. Necessitam pois de eluentes ácidos, sobretudo as agluconas (RIBÉREAU-GAYON, 1968a).

Apresentamos no Quadro V os sistemas de eluentes propostos por HARBORNE (1959) e discutimos seguidamente a sua possível aplicação.

Com efeito HARBORNE (1959) considera, para os eluentes que não contenham ácido mineral, o «BAW» por exemplo, ser importante que o extracto original contenha a quantidade de ácido clorídrico suficiente, com vista a conservá-lo sob a forma de composto deste ácido, quando no seu desenvolvimento se desloca ao longo do suporte. Aconselha também cuidados especiais para o eluente «BAW» quanto ao tempo de repouso. Se for exagerado afecta os valores do R<sub>f</sub>, não devendo todavia tal eluente ser utilizado antes de três dias após a sua preparação.

Para o eluente «BuHCl» diz ser necessário saturar o suporte, antes do desenvolvimento da fase aquosa. Para a técnica da cromatografia bidimensional, usa os pares de eluentes («BAW»; «HAc» a 15 % e «BuHCl», HCl a 1 %) e menos satisfatoriamente (HARBORNE, 1958) os eluentes «BuHCl» e m-cresol - ácido acético - ácido clorídrico (1 + 1 + 1 em volume).

Por sua vez P. RIBÉREAU-GAYON nos seus estudos sobre as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON, 1959 e 1968a) operando com o papel Arches 302, obteve bons resultados com a utilização para primeiro eluente a fase inferior da mistura n-butanol, ácido acético, água (4 + 1 + 5 em volume) e para segundo eluente a fase superior da mesma mistura, aconselhando todavia

QUADRO V

Abreviatura	Composição	Proporção V/V	Fase utilizada
BAW	n-butanol-ácido acético-água	4 + 1 + 5*	superior**
BuHCl	n-butanol-ácido clorídrico 2N	1 + 1	superior**, ***
—	m-cresol-ácido acético-água	50 + 2 + 48	superior
IsoPr	isopropanol-ácido clorídrico 2N	1 + 1	miscível
PhOH	fenol-água	saturado	inferior
—	acetona-ácido clorídrico 0,1N	1 + 3	miscível
—	acetato de etilo-ácido fórmico-água	8 + 2 + 3	superior
1 % HCl	água-ácido clorídrico 12N	97 + 3	miscível
HAc-HCl	água-ácido acético-ác. clorídrico 12N	82 + 15 + 3*	miscível
30 % HAc	água-ácido acético	70 + 30*	miscível

\* Outras proporções são usadas.

\*\* O tempo de uso após a mistura é importante e afecta o valor do Rf.

\*\*\* O BuHCl deve deixar-se ficar em repouso durante 24 horas, assim como o papel deve ficar a saturar com a camada inferior da mistura durante 24 horas.

cautela na respectiva conservação, pois passados alguns dias, surgem ésteres cuja presença é susceptível de alterar os valores de Rf.

FULEKI & FRANCIS (1967) deram preferência ao eluente obtido a partir da mistura de butanol, benzeno, ácido fórmico e água (100 + 19 + 10 + 25 em volume); CONRADIE & NEETHLING (1968) usaram a mistura n-butanol, acetato de etilo, benzeno, ácido fórmico (1 + 1 + 1 + 1 em volume) saturada com paraformaldeído sólido. É possível recorrer, igualmente, à fase inferior da mistura butanol, HCl 2N (1 + 1 em volume) como o fizeram BIOL & MICHEL (1961b) ou como MORTON (1967) ao eluente formado pelo acetato de etilo, etilmetilcetona, ácido fórmico, água (6 + 3 + 1 + 1 em volume), ou ainda como GUPTA (1968) ao «Forestal» e ao «BAW».

DEIBNER (1968) para o estudo destes compostos preferiu o álcool amílico terciário saturado de ácido acético a 2 %, como primeiro eluente, e este saturado de ácido clorídrico 2N como segundo, obtendo uma boa separação entre os glucósidos da peonidina e malvidina que é, em geral, difícil de obter.

Tudo que temos exposto refere-se às antocianinas. Tratando-se das antocianidinas a escolha dos eluentes é ainda mais limitada (HARBORNE, 1958) por serem menos estáveis que as antocianinas quer ao pH, quer à luz. Como exemplo deste efeito vemos que tendem a perder a cor com o eluente «BAW», conseguindo-se no entanto bons resultados se tivermos tratado previamente o suporte com ácido clorídrico diluído. Por este motivo recorre-se a eluentes como o «Forestal», mistura de ácido acético, água, ácido clorídrico (30 + 10 + 3 em volume) que, sendo ácido, permitam uma conservação capaz destes pigmentos. Com efeito, foi conjugando o «Forestal» com a fase superior da mistura n-butanol - ácido clorídrico (1+1 em volume) que RIBÉREAU-GAYON (1968a) fez o estudo destes compostos. Outro eluente a que recorreu, HARBORNE (1958), foi obtido a partir da mistura ácido fórmico, ácido clorídrico, água (5 + 2 + 3 em volume), sendo todavia criticado por MULLICK & BRINK (1967) que lhe apontaram o defeito de má separação das antocianidinas, indicando todavia o ácido fórmico, ácido clorídrico 4N (2 + 1 em volume) como eluente de substituição. Estes autores fizeram igualmente o estudo do eluente ácido acético-ácido clorídrico que originalmente HARBORNE (1958) utilizou para as antocianinas, o que lhes permitiu utilizá-lo no estudo das antocianidinas, propondo também o eluente isopropanol, ácido clorídrico a 5 % (55 + 45 em volume) para o estudo dos compostos considerados.

#### f) — Suportes

O suporte mais vulgarmente utilizado é o papel para cromatografia, ficando a sua utilização sujeita à preferência do manipulador e à finalidade da análise cromatográfica.

Os ingleses dão a preferência ao papel Whatman n.º 1 (HARBORNE, 1959), os alemães ao Schleicher e Schüll 2043bMGL, os japoneses ao Toyo n.º 50 e os franceses ao Arches 302 (JAULMES & NEY, 1960; DEIBNER & BOURZEIX, 1964). Todavia,

quando para além duma identificação se pretende a purificação e isolamento das substâncias recorre-se a papéis como o Whatman n.º 4 (BOURZEIX & BANIOL, 1966), que permite um desenvolvimento mais rápido, ou a papéis mais espessos, como o Whatman n.º 3 ou 3MM (RIBÉREAU-GAYON, 1959), à custa dos quais se consegue uma maior concentração das substâncias a estudar.

A cromatografia em camada fina, mais recente, é usada igualmente no estudo dos compostos polifenólicos considerados. Com efeito, apresenta a vantagem dum tempo de desenvolvimento mais curto e de permitir o emprego de grande número de suportes dos quais a sílica G (Merck Germany) (MORITA & HARUTA, 1963), Kiessigel G (MORTON, 1967) a sílica gel Eastman Chromagram sheet type 6061, 6065, celulose Eastman Chromagram sheet type 6064 (GUPTA, 1968), sílica gel Camag D-5 (CONRADIE & NEETHLING, 1968), cellulose Macherey e Naegel (MN 300) (DEIBNER, 1968) e a Whatman CC41 (ESTEVEZ-PINTO, 1969) são exemplos.

A cromatografia em coluna é também utilizável, tendo sido usada por KARRER & STRONG e KARRER & WEBER, citados por RIBÉREAU-GAYON (1968a), para a separação de duas antocianinas usando como suporte a alumina e o sulfato de cálcio, sendo todavia hoje os resultados assim obtidos superados quer pela cromatografia em papel, quer pela camada fina, e por isso da preferência dos investigadores nesta especialidade.

#### g) — Identificação

As antocianinas aparecem no cromatograma sob a forma de manchas de cores diferentes (HARBORNE, 1958) quando vistas à luz do dia e tomam cores características quando sujeitas a vapores de amónia, podendo ser observadas com vantagem às radiações ultravioletas. Algumas antocianinas manifestam nestas condições uma viva fluorescência vermelha, propriedade esta característica das antocianinas que possuem um radical açúcar na posição 5 (RIBÉREAU-GAYON, 1959).

Todavia, como os 5-monoglucósidos não existem na natureza, as únicas antocianinas que podem ser fluorescentes serão os 3,5 diglucósidos. RIBÉREAU-GAYON (1959) ao estudar este assunto verificou que em meio fracamente ácido só são fluo-

rescentes os 3,5 diglucósidos que não têm os dois oxidrilos na posição orto sobre o núcleo lateral, concluindo igualmente que em meio fortemente ácido outras antocianinas serão fluorescentes às radiações ultravioletas.

É porém do máximo interesse verificar as relações existentes entre o valor do Rf das antocianinas e as respectivas estruturas químicas.

RIBÉREAU-GAYON (1959; 1963) citando os trabalhos de BATE-SMITH & WESTALL mostra a variação do Rf em função do aumento do número de substituintes. Assim, recorrendo ao butanol como eluente conclui:

- O Rf diminui quando o número de oxidrilos aumenta;
- O Rf aumenta quando o número de radicais metoxilos aumenta;
- O Rf diminui quando o número de moléculas de açúcar aumenta.

Pela utilização do eluente formado pela fase inferior da mistura n-butanol, ácido acético, água (4 + 1 + 5 em volume) obteve este autor as seguintes relações:

- O Rf diminui quando o número de oxidrilos aumenta;
- O Rf aumenta quando o número de radicais metoxilos aumenta;
- O Rf aumenta quando o número de moléculas de açúcar aumenta.

Por sua vez HARBORNE (1959) ao estudar o mesmo assunto notou a existência de determinadas relações entre o Rf e a estrutura do composto. Com efeito segundo este autor quanto maior for o número de oxidrilos na molécula da antocianidina, tanto menor será o valor do Rf nos eluentes alcoólicos («BuHCl» e «BAW») e aquosos (ácido clorídrico a 1% e «HAcHCl»). Desta forma os glucósidos correspondentes da pelargonidina, cianidina e delfinidina podem sempre ser colocados por ordem decrescente do valor do Rf.

A metoxilação por sua vez tem efeito contrário ao da hidroxilação. Efectivamente quanto maior for o número de grupos metoxilos, maior será o valor do Rf, sendo todavia

o decréscimo provocado pela metoxilação um pouco menor do que o causado por hidroxilação.

No que diz respeito à glucosidação HARBORNE (1959) notou igualmente uma relação directa entre o valor do Rf e o número de radicais de açúcar, que sendo totalmente independente da natureza da antocianidina, provoca um aumento do valor do Rf nos eluentes aquosos e o contrário nos alcoólicos («BAW» ou «BuHCl»). Todavia, esta simples relação para além de depender da natureza do açúcar, complica-se se os radicais deste estão ligados em mais de uma posição na molécula.

Pela acilação no dizer do autor os efeitos produzidos no valor do Rf são contrários aos da glucosidação, provocando assim aumentos no valor do Rf com eluentes baseados no n-butanol e inversamente, isto é, mais baixos valores do Rf com eluentes aquosos.

Importante é também referir o Quadro VI apresentado por HARBORNE (1959) que permite, partindo dos valores do Rf, obtidos com diversos eluentes, das cores e das fluorescências respectivas às radiações ultravioletas, identificar algumas antocianinas por ele assinaladas.

Todavia, convém salientar, quando haja em vista a identificação rigorosa de uma antocianina deverá conhecer-se com precisão (RIBÉREAU-GAYON, 1963):

- a natureza da aglucona;
- a natureza do radical ou radicais de açúcar;
- a natureza das ligações dos açúcares na aglucona;
- eventualmente a natureza do radical ácido ligado ao heterósido, no caso da antocianina acilada.

Para obter este efeito hidrolisa-se em meio clorídrico 2N a antocianina, identificando-se a aglucona por cromatografia assim como a fracção glucosídica, esta última também por sacarimetria, por exemplo. No caso das antocianinas aciladas, os resíduos são facilmente eliminados durante o tratamento por serem lábeis as ligações existentes entre as agluconas e os ácidos, permitindo assim um fácil estudo de tais fracções.

QUADRO VI

Glucósidos	Valores de Rf				Cor	Fluorescência ao ultravioleta
	BAW	BaHCl	HCl a 1%	HA-c-HCl		
<b>Cianidina</b>	0,38	0,25	0,07	0,26	magenta	escura
3-monoglucósido . . . . .	0,37	0,24	0,07	0,26	—	magenta
3-monogalactósido . . . . .	0,37	0,25	0,19	0,43	—	—
3-ramnoglucósido . . . . .	0,36	0,24	0,24	0,51	magenta	escura
3-xiloglucósido . . . . .	0,33	0,22	0,34	0,61	—	magenta
3-diglucósido . . . . .	0,28	0,06	0,16	0,40	magenta	brilhante
3,5-diglucósido . . . . .	0,25	0,08	0,36	0,59	—	vermelha
3-ramnoglucósido-5-glucósido . . . . .						
<b>Peonidina</b>	0,41	0,30	0,09	0,33	cravo	cravo escuro
3-monoglucósido . . . . .	0,31	0,10	0,17	0,44	cravo	fluorescente
3,5-diglucósido . . . . .	0,29	0,12	0,37	0,60	—	rosa
3-ramnoglucósido-5-glucósido . . . . .						
<b>Delfinidina</b>	0,26	0,11	0,03	0,18	púrpura	púrpura escuro
3-monoglucósido . . . . .	0,30	0,15	0,11	0,37	»	»
3-ramnoglucósido . . . . .	0,15	0,03	0,08	0,32	»	»
3,5-diglucósido . . . . .						
<b>Petunidina</b>	0,35	0,14	0,04	0,22	»	»
3-monoglucósido . . . . .	0,35	0,16	0,13	0,42	»	»
3-ramnoglucósido . . . . .	0,24	0,04	0,08	0,32	»	brilhante
3,5-diglucósido . . . . .	0,23	0,06	0,37	0,61	—	púrpura
3-ramnoglucósido-5-glucósido . . . . .						
<b>Malvidina</b>	0,38	0,15	0,06	0,29	malva	malva escuro
3-monoglucósido . . . . .	0,31	0,03	0,13	0,42	malva	fluorescente
3,5-diglucósido . . . . .	0,30	0,05	0,40	0,63	—	cereja
3-ramnoglucósido-5-glucósido . . . . .						

**h) — Isolamento, purificação e identificação das antocianidinas obtidas por hidrólise ácida do vinho**

Dissemos já que as antocianinas não se encontram nas uvas e no vinho sob a forma de agluconas, sendo igualmente raro a sua existência na natureza neste estado. Ao ser pretendido efectuar o seu isolamento e estudo, temos que provocar a hidrólise ácida, em meio clorídrico 2N, levando à ebulição sob tubo de refluxo durante meia hora (RIBÉREAU-GAYON, 1959). Arrefece-se em seguida e faz-se a extracção das antocianidinas com a quantidade mínima de álcool amílico, procedendo-se então ao seu isolamento por cromatografia utilizando os eluentes «Forestal» e a fase superior do eluente butanol-ácido clorídrico 2N (1 + 1 em volume).

Obtido assim o isolamento destas substâncias é possível, pois, proceder-se facilmente à sua identificação a partir do Rf, da cor ou das respectivas fluorescências ao ultravioleta.

**5 — TANINOS**

Formam os taninos um grupo de compostos bastante complexo e de difícil definição, podendo dizer-se no entanto que as suas principais propriedades estão ligadas à aptidão de se combinarem com as proteínas e compostos polimerizados tais como a celulose e a pectina (RIBÉREAU-GAYON, 1968a). Tais propriedades justificam a sua importância na curtimenta das peles, a qual consiste na formação duma combinação de taninos com o colagénio, assim como a destruição dos enzimas pelos taninos devido à combinação com a sua fracção proteica e ainda da adstringência dos produtos vegetais, que, segundo BATE-SMITH, citado por RIBÉREAU-GAYON (1968a), é provocada pela precipitação das proteínas e das glicoproteínas da saliva, que perde assim, as suas propriedades lubrificantes na presença dos taninos.

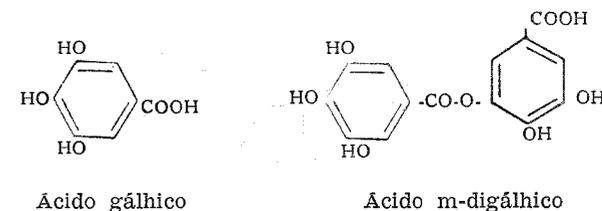
SWAIN e BATE-SMITH igualmente citados por RIBÉREAU-GAYON (1968a) consideram os taninos como sendo todas as substâncias naturais que possuem propriedades físicas e químicas próximas que manifestam as substâncias usadas na preparação do couro, o que significa que devem ser compostos

fenólicos solúveis na água, terem pesos moleculares entre 500 e 3000, darem as reacções clássicas dos fenóis e serem dotadas de propriedades especiais tais como a capacidade de precipitarem os alcalóides, a gelatina e outras proteínas. Esta definição compreende os compostos que não são taninos no sentido comercial, quer dizer, que não têm importância económica na curtimenta das peles, mas exclui um grande número de substâncias, que apenas têm de comum com os taninos a capacidade de reduzirem o permanganato e darem reacção corada com os sais de ferro.

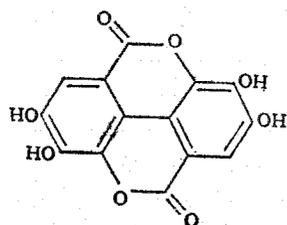
Partindo destes conceitos adoptaremos neste trabalho, entre as muitas classificações existentes (LENCASTRE, 1940; FERRÃO, 1963), aquela que divide os taninos em hidrolisáveis e condensados por corresponder a tipos estruturais bem diferenciados.

São os taninos hidrolisáveis (RIBÉREAU-GAYON, 1968a) resultantes da esterificação duma molécula glucídica com o ácido gálgico ou um dos seus derivados, dando-se-lhes por esse motivo a designação de taninos gálgicos e pirogálgicos.

Fácilmente hidrolisáveis por via enzimática dividem-se por sua vez em taninos gálgicos ou galhotaninos e taninos elágicos ou elagi-taninos, em que os galhotaninos são constituídos por ésteres de glucose ou de um polissacarido e por ácido gálgico ou ácido m-digálgico, que por sua vez dá ácido gálgico por hidrólise.



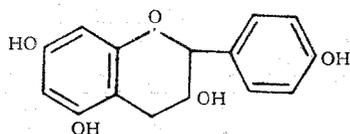
Por sua vez os elagitaninos caracterizam-se por darem, pela hidrólise ácida, além do ácido gálgico, derivados deste ácido, nomeadamente o ácido elágico.



Acido elágico

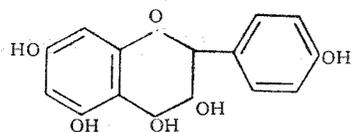
Os taninos condensados, também designados por catéquicos, resistem à hidrólise (RIBÉREAU-GAYON, 1968a); e são aqueles que resultam da polimerização de moléculas elementares das flavanas (catequinas e leuco-antocianidinas), cabendo descrever aqui as flavana-3-ol e flavana 3,4-diol por serem considerados os seus precursores (RIBÉREAU-GAYON, 1964b, 1965).

A flavana-3-ol de forma de estrutura:



Flavana-3-ol (catequina).

não se encontra na natureza sob a forma heterosídica e distingue-se da flavana-3,4-diol pelo seu diferente comportamento por aquecimento em meio ácido.



Flavana-3,4-diol (leucoantocianidina).

Com efeito, as flavanas-3,4-diol nestas condições são parcialmente transformadas em antocianidinas, enquanto que a flavana-3-ol, qualquer que seja a sua forma, monómera ou condensada, sofre uma polimerização que a transforma em produtos amarelo-acastanhados insolúveis e de pesos moléculares elevados: as flobafénas.

Todavia, as flavanas-3,4-diol, que, como foi dito, se transformam em antocianidinas por aquecimento em meio ácido são formas incolores que sofrem designações desde leucoantocianinas ou leucoantocianinas por se supor a existência de formas heterosídicas, o que não está provado, a protoantocianidinas por FREUDENBERG & WEINGES (1962) e preferentemente por leucoantocianidinas por RIBÉREAU-GAYON (1968a).

Porém, qualquer que seja a designação, o termo «leuco» pode conduzir a confusões, pois designa igualmente as formas monómeras e polímeras, das quais só estas últimas são verdadeiramente taninos (RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1964), visto as formas monómeras das flavanas-3-ol e flavana-3,4-diol não possuem propriedades tânicas, nomeadamente a de formarem combinações com as proteínas.

Com efeito este processo complicado de polimerização conduz à formação de formas oligómeras (de 2 a 10 moléculas elementares), com francas propriedades tânicas, que por sua vez originam formas muito polimerizadas (mais de 10 moléculas), cujas propriedades tânicas são cada vez menos notórias, com o aumento do peso molécular, podendo chegar até a desaparecer completamente.

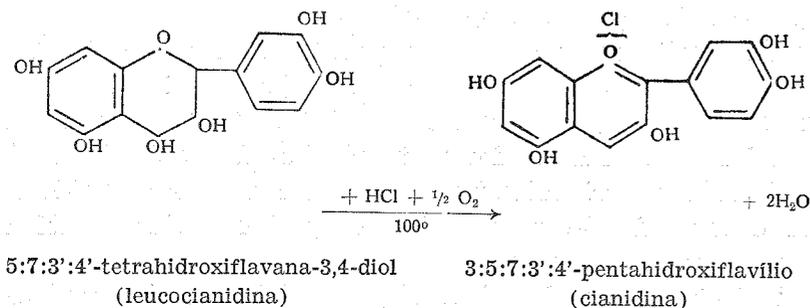
Tudo isto evidencia a dificuldade que há em definir taninos, considerando-os porém constituídos por uma mistura de vários polímeros designados por flavolanas (RIBÉREAU-GAYON, 1968a) que resultaram da condensação das moléculas das flavanas.

#### a) — Os taninos da uva e do vinho

Os taninos, constituintes das películas, grainhas e engaço das uvas, são igualmente constituintes importantes dos vinhos tintos, neles variando de 1,5 a 4,5 g/l. Factores importantes das propriedades organolépticas, interessará pois, dizer algo, embora breve, sobre tais compostos do vinho. Considerando a classificação atrás citada que permite dividir os taninos em hidrolisáveis e condensados, verifica-se que não existem os primeiros no vinho. Com efeito, raciocinando em termos do já exposto, verifica-se que para além da existência de ácido gálgico não ser garantia absoluta da presença de taninos hidrolisáveis, visto no vinho por vezes existirem galatos de catequina, as quantidades doseadas de ácido gálgico num vinho

são pequenas ou mesmo nulas (RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1964). Obviamente assumem no caso do vinho aspecto relevante os taninos condensados que têm como precursores as flavanas-3-ol e as flavanas-3,4-diol (RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1964).

Das flavanas-3-ol a mais corrente sob a forma monómera é a (+) catequina (RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1966) e das flavanas-3,4-diol, a leucocianidina (5:7:3':4'tetrahidroxiflavana-3,4-diol) que muito embora seja duvidosa a sua presença no vinho sob a forma monómera (RIBÉREAU-GAYON, 1957a e 1957b) origina por aquecimento em meio ácido a cianidina. Assim:



Admite-se todavia que é através dum complicado processo de polimerização que tais precursores originam os oligómeros, com propriedades acentuadamente tânicas, e que pelo aumento do peso molecular acabem por se insolubilizar originando polímeros que correspondem ao nome atrás citado de flobafénas (RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1966). Este estado de condensação é da maior importância, pois aumenta ao longo do envelhecimento e intervém de forma preponderante na coloração dos vinhos tintos, mais particularmente no caso dos vinhos velhos (RIBÉREAU-GAYON & NEDELTCHEV, 1965; RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET, 1966), visto as antocianas responsáveis pela coloração dos vinhos novos desaparecerem por precipitação e formarem o constituinte mais importante do seu depósito (ALMEIDA, 1960).

## II — SEGUNDA PARTE

### 6 — MATERIAL

Ao dar início a este trabalho, admitimos ser a prática mais correcta para o estudo do envelhecimento, proceder a análise anual de exemplares duma mesma amostra de vinho devidamente conservada. Todavia, por não ser exequível, optou-se por outra, menos satisfatória, que consiste na análise de amostras de sucessivos anos de uvas, provenientes dos mesmos locais, castas e vinhedos, e para as quais se usou, sempre, a mesma técnica de vinificação. As amostras provêm da Adega Cooperativa do Fundão que vinifica uvas desse Concelho, bem como das de Penamacor e Idanha, isto é, duma região com condições ecológicas bem definidas, clima pouco variável de ano para ano, e com vinhedos constituídos por um surtido de castas que têm variado pouco.

Começemos por classificar ecológicamente tal região. Para BARROS GOMES (1878) pertence à Beira Meridional, caracterizada duma maneira geral por estar exposta aos suões alentejanos tendo só pelo norte o abrigo das grandes serras e localizando-a na sua carta xilográfica (GOMES, 1878) como situada ligeiramente abaixo do limite sul da *Betula alba* L. apresentando como espécies florestais mais correntes o *Quercus Toza* Bosc <sup>(1)</sup> e *Castanea vulgaris* Lam.

Por sua vez AMORIM GIRÃO (1941) considera-a no seu esboço fitoclimático como pertencente à zona sub-atlântica possuindo o *Quercus Toza* <sup>(1)</sup> (carvalho negral), o *Pinus pinaster* (pinheiro bravo) e o *Castanea sativa* (castanheiro) como essências florestais dominantes fazendo no entanto uma referência especial à Cova da Beira (região onde fica localizado o Fundão), como sendo abrigada dos suões pela Serra da Gardunha engravada entre esta e a Estrela e banhada pelo Zêzere o que lhe confere um aspecto assinalável — oásis — na sua expressão.

Mais recentemente PINA MANIQUE E ALBUQUERQUE (1954) na sua carta ecológica de Portugal sub-divide esta região em duas zonas Cova da Beira e Campo Albicastrense, caracte-

<sup>(1)</sup> Actualmente designado *Quercus pyrenaica* Willd.

rizando a primeira por possuir dois níveis a saber: o basal com menos de 400 metros e o sub-montano entre 400 e 700 metros. O nível basal pertence segundo o autor (ALBUQUERQUE, 1954) à zona fitoclimática atlante mediterrânea (AM) com o carvalho português, zambujeiro, castanheiro, pinheiros manso e bravo como elementos autofíticos característicos e o nível sub-montano entre 400 e 700 metros como pertencente à zona sub-atlântica, atlante-mediterrânea (SA × AM) com os elementos característicos carvalho negral, carvalho português, sobreiro, zambujeiro, castanheiro bem como os pinheiros manso e bravo.

Por sua vez o Campo Albicastrense que inclui Penamacor e Idanha apresenta segundo este autor (ALBUQUERQUE, 1954) nível basal pertencente à zona fitoclimática sub-mediterrânea (SM) e autofiticamente caracterizada pela presença do carvalho português, sobreiro, azinheira, zambujeiro e pinheiro manso e bravo.

Descrita a região de recolha das massas vinárias interessa sublinhar que a tecnologia de vinificação é a comumente usada nas Adeegas Cooperativas, utilizando-se porém a uva desengaçada antes da curtimenta. Ao fim dum ano os vinhos foram engarrafados em garrafas de vidro escuro de 7,5 decilitros.

È pois sobre este material proveniente de castas, dentre as quais predominam o Bastardo e Bastardinho que incidirá o estudo a que nos propuzemos empreender.

## 7 — MÉTODOS

A prova foi executada segundo as bases e a nomenclatura utilizada pela Junta Nacional do Vinho. A intensidade e tonalidade da cor foi obtida pelas relações SUDRAUD (1962) e pelo método rápido do O. I. V. (1962-1970), tendo sido determinada a cor pròpriamente dita pelo método de referência do O. I. V. (1962-1970).

Paralelamente, determinámos quantitativamente os compostos fenólicos pelo índice de permanganato (RIBÉREAU-GAYON, 1968a) e as antocianinas pelos métodos de pH e do bissulfito de sódio descritos por RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET (1965). Para esta última determinação foi necessário extrair e isolar as antocianinas das películas das uvas a fim de elaborar uma curva padrão.

Realizámos assim separadamente a extracção e purificação das antocianinas das seguintes castas:

Bastardinho proveniente da Cova da Beira  
Bastardo proveniente da Cova da Beira  
Bastardo proveniente da Região do Douro  
Aramon proveniente da Tapada da Ajuda  
Uva de mesa (não identificada) adquirida no comércio

No entanto como esta extracção e purificação não é suscintamente descrita por RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET fizemos uma compilação das técnicas de KOZÔ HAYASHI (1962) que resolvemos descrever por serem tais técnicas pouco comuns entre nós. Retiram-se à mão as películas dos bagos de uva e lavam-se com água destilada para retirar o açúcar que porventura lhes fique aderente. Comprimimos bem as películas na mão, para retirar a maior quantidade possível de água e enxugámo-las com papel de filtrar. Pesámo-las, colocámo-las num balão e adicionámos uma massa de solução de metanol-ácido clorídrico (99 + 1 em volume) igual a quatro vezes a massa das películas. Agitámos ocasionalmente e deixámos em repouso até ao dia seguinte. Decantámos e lavámos seguidamente as películas com metanol-ácido clorídrico (99 + 1 em volume) utilizando um volume igual a metade do anteriormente usado. Juntámos as duas extracções e filtrámos. Lavámos o filtro com a já referida solução de metanol e ácido clorídrico e medimos o volume do filtrado. Em seguida, evaporámos este no vácuo a uma temperatura não superior a 40° C, até um quinto desse volume, num evaporador rotativo. Filtrámos novamente, adicionámos um volume três vezes superior de éter etílico e agitámos bem. Colocámos o balão num frigorífico durante dez dias e passado esse tempo separámos por decantação o líquido xaroposo escuro. Dissolvemos este líquido num volume  $V_1$ , da solução de ácido clorídrico a 0,5 %, que corresponde a metade da massa das películas, e juntámos igual volume da solução saturada a frio de ácido pícrico. Deixámos no frigorífico durante 24 horas. Filtrámos novamente e dissolvemos o precipitado em meio volume de metanol. Adicionámos um décimo de volume de metanol-ácido clorídrico (90 + 10 em volume) a fim da solução ficar a 2 % de ácido clorídrico. Diluímos dez vezes este volume em éter etílico purificado e

deixámos ficar durante 24 horas no frigorífico. As antocianinas precipitam, tomando a coloração castanha avermelhada. Repe- timos várias vezes as precipitações com ácido pícrico e éter etílico. Após a última precipitação com éter etílico as anto- cianinas são dissolvidas em metanol acidulado com ácido clo- rídrico e o extracto é evaporado no vácuo à temperatura ambiente.

Obtidas assim as antocianinas elaborámos uma curva padrão que nos serviu para a determinação quantitativa das antocianinas no vinho pela aplicação dos métodos do pH e do bissulfito de sódio descritos por RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET (1965).

Igualmente fizemos a determinação da evolução qualita- tiva das antocianidinas. Para esse efeito procedemos à hidrólise ácida das antocianinas do vinho (RIBÉREAU-GAYON, 1959) com vista à obtenção das antocianidinas. Assim, tomámos 20 cm<sup>3</sup> de vinho para um balão de 100 cm<sup>3</sup> ao qual adicionámos 5 cm<sup>3</sup> de ácido clorídrico concentrado, a fim de obtermos uma solução clorídrica aproximadamente 2N. Colocámos o balão em banho maria fervente durante pelo menos meia hora, sob tubo de refluxo. Após a hidrólise, arrefecemos o hidrolisado em água corrente e filtrámos. As antocianinas são extraídas do filtrado usando a menor quantidade possível de álcool amílico, isto é, o suficiente para formar fase. O extracto assim obtido é apli- cado directamente no suporte cromatográfico tendo nós utili- zado as seguintes técnicas cromatográficas:

Cromatografia descendente monodimensional e bidimensio- nal em papel (RIBÉREAU-GAYON, 1959).

Cromatografia ascendente monodimensional e bidimensional em camada fina (ESTEVES-PINTO, 1969).

Para as duas técnicas usámos sempre como primeiro eluente o «Forestal» e para segundo a fase superior da mistura n-buta- nol-ácido clorídrico 2N (1 + 1 em volume). Como suportes, recorreremos ao papel Whatman N.º 1 e N.º 3 para a cromato- grafia em papel (RIBÉREAU-GAYON, 1959), e à celulose Whatman CC41 para a cromatografia em camada fina, utilizando neste caso a espessura de 0,5 mm (ESTEVES-PINTO, 1969). Aplicámos no suporte, no mesmo ponto, quatro vezes a quantidade de 0,01 cm<sup>3</sup>

e a observação foi efectuada quer à luz do dia quer às radia- ções ultravioletas. A identificação foi feita por confronto com cromatogramas obtidos com antocianidinas puras (padrões).

Para o estudo dos flavonois foi utilizada a cromatografia monodimensional e bidimensional em camada fina. Para esse efeito extraímos os flavonois do vinho com acetato de etílo da seguinte maneira:

Medimos 20 cm<sup>3</sup> de vinho para um balão de separação e fizemos três extracções sucessivas com quantidades de 5 cm<sup>3</sup> cada uma de acetato de etílo, tendo-se seguido a concentração do extracto em estufa de vácuo à temperatura ambiente. Dissolvemos seguidamente o extracto na quantidade de 1 cm<sup>3</sup> de acetato de etílo e fizemos a sua aplicação no mesmo ponto de quatro vezes a quantidade de 0,01 cm<sup>3</sup> do extracto dissol- vido (ESTEVES-PINTO, 1969). O suporte foi a celulose Whatman CC41, utilizando a espessura de 0,5 mm (ESTEVES-PINTO, 1969).

No caso da cromatografia bidimensional, fizemos os desen- volvimentos utilizando para primeiro eluente a fase inferior da mistura álcool isoamílico - ácido acético - hexano - água des- tilada (3 + 1 + 3 + 3 em volume) e para segundo a fase supe- rior da mistura álcool amílico terciário - água destilada (1 + 1 em volume) (BOURZEIX & BANTOL, 1966), tendo a vizualização dos flavonois sido efectuada às radiações ultravioletas directamente ou após exposição a vapores de amónia. A identificação tam- bém neste caso foi feita por confronto com cromatogramas obtidos com flavonois puros (padrões).

## 8 — RESULTADOS

As análises constantes deste trabalho incidiram sobre as amostras referentes às colheitas dos anos de 1968, 1967, 1965, 1963, 1961, 1959, 1958, 1957, 1956, 1952, 1951.

Foi nosso intuito relacionar o ensaio organoléptico (prova) com os resultados obtidos para os compostos cuja pesquisa e determinação efectuámos, assim como tentar avaliar a impor- tância destes, no comportamento evolutivo dum vinho durante o envelhecimento.

A apreciação organoléptica efectuada segundo as normas da Junta Nacional do Vinho, que figura no Quadro VII, foi executado por vários técnicos e um perito provador.

Da observação do quadro verificámos a passagem da cor granada à rubi com o envelhecimento, para finalizar na cor tijolo. A cor rosada da espuma corresponde a cor granada do vinho, e o cheiro que inicialmente é vinoso passa a particular, tomando nas amostras mais antigas um agradável odor característico a velho, à medida que o sabor se vai tornando mais macio e mais leve. Por sua vez a adstringência que é variável ao longo dos anos dá-nos todavia a sensação de que evolui de taninosa a macia e até aveludada.

Quanto à cor, fizemos as determinações da tonalidade e intensidade segundo SUDRAUD (1962), tonalidade e intensidade pelo método rápido O. I. V. (O. I. V., 1962-1970) e ainda a cor e suas características pelo método de referência O. I. V. (1962-1970).

As absorvências foram medidas em espectrofotómetro, na espessura de 0,5 cm, havendo por isso a necessidade de convertê-las à espessura própria de cada método. No Quadro VIII figuram os valores obtidos.

Pela observação simples deste quadro verificamos que a tonalidade segundo SUDRAUD aumenta normalmente com o envelhecimento, notando-se igualmente uma tendência de aumento na intensidade obtida pelo método rápido O. I. V. Por este método nota-se porém uma evolução interessante na tonalidade que de valores positivos nos vinhos novos passa a valores negativos nos vinhos mais velhos, tanto maiores em valor absoluto quanto maior for a idade.

Pelo método de referência O. I. V. determinámos as coordenadas de cromaticidade (x, y) a luminosidade (Y %), o comprimento de onda dominante e a pureza da cor, dando-nos a ideia de elevarem-se a pureza da cor bem como a luminosidade, nas amostras que à prova (ESTEVES-PINTO, 1969) se apresentaram caracteristicamente mais envelhecidas.

Para as substâncias polifenólicas que formam o assunto central do nosso trabalho, utilizámos para a análise qualitativa e semi-quantitativa dos compostos flavonois a técnica de BOURZEIX & BANIOL (1966) empregando todavia como foi assinalado no capítulo «Métodos» o suporte Whatman CC41 (ESTEVES-PINTO, 1969). Ensaíamos a aplicação directa do vinho no suporte (BOURZEIX & BANIOL, 1966) assim como o extracto obtido com o éter etílico, álcool amílico assim como o obtido

com acetato de etilo. De todos estes procedimentos achámos o melhor para o estudo em vista o que consiste na aplicação do extracto obtido com acetato de etilo (ESTEVES-PINTO, 1969). A visualização como foi assinalado no capítulo «Métodos» foi efectuada às radiações ultravioletas e a identificação a partir dos compostos puros (padrões), campferol, quercetina, miricetina, rutina e quercitrina (ESTEVES PINTO, 1969).

Como primeira observação, verificámos pelo cromatograma N.º 1 (ver apêndice) que as agluconas flavonois ficaram perto do ponto de aplicação e os glucósidos mais ou menos a meio do cromatograma usando como eluente de desenvolvimento o eluente n.º 1. Pelo cromatograma N.º 2 obtido pela utilização do eluente n.º 2 como eluente de desenvolvimento, verificámos que a miricetina se encontra mais perto do ponto de aplicação, seguida da quercetina e do campferol assim como a rutina a meio do cromatograma e a quercitrina um pouco mais distante do ponto de aplicação. Mas é o cromatograma bidimensional N.º 3 obtido pela utilização dos eluentes n.º 1 e n.º 2 que nos serviu como elemento principal de comparação com os cromatogramas dos vinhos em estudo.

Fizémos pois o estudo da evolução qualitativa e semi-quantitativa das agluconas flavonois durante o envelhecimento cujos resultados estão expressos nos cromatogramas N.º 4 a N.º 15 referentes às amostras N.º 1 a N.º 12, e no Quadro XII onde foi necessário considerar a dimensão e a intensidade da cor da mancha. Assim considerámos como +++ a mancha de maior dimensão e de maior intensidade de cor, como ++ a mancha de dimensão média, como + a mancha de pequena dimensão e média intensidade de cor e por vestígio a mancha de pequena dimensão e fraca intensidade de cor. Pelo quadro verifica-se que a miricetina desaparece, no caso considerado, ao fim de cinco anos, o campferol ao fim de onze e a quercetina que se mantém presente ao longo do envelhecimento numa forma mais ou menos uniforme desaparece nas amostras N.º 9 e N.º 12 e que apresentam características de mais envelhecidas.

Quanto ao estudo da evolução quantitativa das antocianinas ao longo do envelhecimento utilizámos dois métodos (pH e bissulfito de sódio) já referidos no capítulo «Métodos». Para o efeito isolámos como já descrevemos as antocianinas das castas Bastardinho, Bastardo proveniente da Cova da

QUADRO VIII

N.º da amostra	Ano da colheita	Método rápido O. I. V.		Método de referência O. I. V.				Pureza %			
		Espessura conferida pela tina 1 mm		Espessura conferida pela tina 1 cm		Comprimento de onda dominante mm	Luminosidade Y %				
		Tonalidade	Intensidade	A <sub>530</sub> -A <sub>620</sub>	A <sub>530</sub> +A <sub>620</sub>				Coordenadas cromáticas		
		Tonalidade	Intensidade	A <sub>530</sub> -A <sub>620</sub>	A <sub>530</sub> +A <sub>620</sub>	x	y				
1	1968	0,715	0,463	0,776	4,63	37° 49'	0,6398	0,3113	6,717	619	87
2	1967	0,776	0,563	0,708	5,63	35° 18'	0,6605	0,3191	4,974	615,5	95
3	1965	0,910	0,529	0,250	5,29	14° 05'	0,6553	0,3272	5,756	612	95
4	1963	0,912	0,520	0,238	5,20	13° 23'	0,6331	0,3280	6,076	612	95
5	1961	1,025	0,567	-0,066	5,67	3° 47'	0,6599	0,3299	5,930	611,2	97,2
6	1959	1,165	0,382	-0,290	3,82	-16° 13'	0,6049	0,3529	12,587	604,8	89
7	1958	1,011	0,768	-0,038	7,68	2° 10'	0,6735	0,3247	3,797	613	99,8
8	1957	1,069	0,600	-0,196	6,00	-11° 05'	0,6613	0,3297	5,123	611,2	97,3
9	1956	1,518	0,632	-1,292	6,32	-52° 16'	0,6419	0,3549	5,107	604	99
10	1955	1,302	0,465	-0,612	4,65	-31° 28'	0,6238	0,3552	8,910	604	94,4
11	1952	1,160	0,527	-0,390	5,27	-21° 19'	0,6484	0,3391	7,623	608,2	97
12	1951	1,530	0,926	-1,936	9,26	-62° 41'	0,6669	0,3329	2,423	610,2	100

Beira e Douro, Aramon e ainda de uma uva de mesa não identificada que adquirimos no Comércio. Tal isolamento pode ser pois verificado nos cromatogramas N.º 16 e N.º 17.

A partir de diferentes concentrações das antocianinas isoladas e duma antocianina pura (malvina), proveniente do laboratório do UNIVERSITÄTS-INSTITUT FÜR LEBENSMITTEL-CHEMIE, de Francfort sobre o Meno dirigido pelo Professor DIEMAIR, obtivemos as diferenças das absorvências para essas diferentes concentrações, usando os métodos de pH e do bissulfito de sódio.

Os resultados obtidos encontram-se nos Quadros IX e X.

QUADRO IX

Diferenças de absorvências obtidas pelo método de pH para as diferentes concentrações em antocianinas

CASTA	Concentrações em antocianinas (mg/l)				
	375,0	187,5	93,8	46,9	23,4
Bastardinho (Cova da Beira)	0,896	0,434	0,223	0,103	0,047
Bastardo (Cova da Beira)	0,765	0,404	0,197	0,109	0,055
Bastardo (Douro)	0,721	0,372	0,199	0,102	0,055
Aramon	1,202	0,621	0,321	0,160	0,084
Uva de Mesa (não identificada)	1,333	0,711	0,361	0,180	0,088
Malvina	1,553	0,621	0,306	0,153	0,072

Assim, com os pares de valores, diferenças das absorvências e respectivas concentrações das antocianinas traçamos para cada uma das castas e cada um dos métodos as respectivas curvas padrões, que no caso presente são rectas.

Todavia para mais fácil interpretação dos quadros anteriores analisemos unicamente os resultados obtidos para as concentrações de 375 mg/l. Verificámos que as diferenças existentes entre as castas Bastardinho e Bastardo quer proveniente do Douro quer da Cova da Beira são mínimas, o mesmo já não sucedendo com a casta Aramon e uva de mesa, não iden-

QUADRO X

Diferenças de absorvências obtidas pelo método do Bissulfito de sódio para as diferentes concentrações em antocianinas

CASTA	Concentrações em antocianinas (mg/l)				
	375,0	187,5	93,8	46,9	23,4
Bastardinho (Cova da Beira)	0,419	0,210	0,109	0,057	0,034
Bastardo (Cova da Beira)	0,358	0,173	0,094	0,051	0,031
Bastardo (Douro)	0,318	0,169	0,095	0,044	0,024
Aramon	0,559	0,283	0,150	0,088	0,045
Uva de Mesa (não identificada)	0,595	0,314	0,154	0,086	0,047
Malvina	0,562	0,250	0,123	0,064	0,030

tificada, cujos valores se aproximam dos obtidos para a malvina. Sendo a malvina um diglucósido, tal aproximação pode ser devida à sua presença nas castas Aramon e na uva de mesa não identificada. Desta forma resolvemos usar unicamente os valores médios das absorvências para o traçado das curvas padrões obtidos a partir das castas Bastardo e Bastardinho, e que são as castas que predominantemente deram origem ao vinho.

Obtivémos assim o Quadro XI:

QUADRO XI

Valores médios das diferenças de absorvências para as diferentes concentrações das antocianinas

Concentração mg/l	Método do pH	Método do bissulfito de sódio
375,0	0,794	0,365
187,5	0,403	0,184
93,8	0,206	0,099
46,9	0,104	0,051
23,4	0,052	0,030

A partir das curvas assim obtidas determinámos a evolução quantitativa das antocianinas cujos valores se encontram no Quadro XII. A simples observação desse quadro permite-nos verificar a diminuição quantitativa com o envelhecimento das antocianinas que de 244 mg/l passa a 19 mg/l e de 246 mg/l a 23 mg/l, valores estes obtidos pelos métodos do pH e bissulfito de sódio respectivamente. Também se nota uma diminuição do seu quantitativo para metade do primeiro para o segundo ano e deste para o quarto ano, notando-se igualmente uma tendência para o seu valor diminuir, nunca atingindo porém o valor zero, talvez, como fazem sublinhar RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET (1965), devido a deficiência dos próprios métodos.

Outro assunto ainda ligado ao estudo das substâncias polifenólicas que despertou o nosso interesse foi averiguar a possível não existência de antocianidinas no vinho. Para esse efeito obtivemos os cromatogramas N.º 16 e N.º 17 desenvolvidos respectivamente com os eluentes «Forestal» e a fase superior da mistura n-butanol - ácido clorídrico 2N (1 + 1 em volume). Fizémos a aplicação de uma amostra de vinho, de antocianinas isoladas das castas atrás referidas, de uma antocianina (malvina) e de uma antocianidina (cianidina). Pela observação destes cromatogramas verificámos que no desenvolvimento cromatográfico do vinho nos aparece somente uma mancha intensa vermelha com Rf igual ao das antocianinas, verificando-se assim a não existência de antocianidinas livres no vinho e igualmente, aliás como foi já assinalada, a pureza das antocianinas isoladas das diferentes castas. A observação do cromatograma N.º 18 no qual foram desenvolvidos três antocianidinas puras (padrões), e as antocianidinas obtidas por hidrólise ácida dum vinho novo e velho e ainda um vinho novo e outro velho permite-nos verificar que nos vinhos hidrolisados nos aparecem três manchas de cor vermelha (antocianidinas), que em cromatografia bidimensional se subdividem em cinco, correspondentes às antocianidinas: delfinidina, cianidina, malvidina, petunidina e peonidina.

A verificação destas cinco antocianidinas pela comparação com cromatogramas de outros autores (FERNANDES, 1958) permitiu-nos tratar da evolução qualitativa e semi-quantitativa destas antocianidinas ao longo do envelhecimento. Para o efeito considerámos como +++ as manchas de maior dimensão

QUADRO XII  
Resultados da evolução das substâncias fenólicas

N.º da amostra	Ano da colheita	Índice de permanganato	Agluconas flavonóis			Antocianinas mg/l		Antocianidinas (obtidas por hidrólise ácida do vinho)					
			Miricetina	Quercetina	Campferol	Bissulfito	pH	Delfinidina	Petunidina	Cianidina	Malvidina	Peonidina	
1	1968	49,0	+++	++	++	246	244	++	++	++	++	++	++
2	1967	55,5	+++	+++	++	130	116	++	++	++	++	++	++
3	1965	32,25	+++	+++	++	61	47	+	+	++	++	++	++
4	1963	34,5	+++	+++	++	55	45	+	+	++	++	+	++
5	1961	48,5	—	+++	++	50	44	—	—	++	++	—	—
6	1959	40,0	—	+++	+	27	20	—	—	++	++	—	—
7	1958	51,0	vest.	+++	++	52	45	+	+	++	++	+	+
8	1957	47,25	vest.	+++	++	33	27	+	+	++	++	+	+
9	1956	16,5	—	—	—	41	38	—	—	+	+	+	+
10	1955	32,0	—	++	—	33	26	+	+	++	++	—	—
11	1952	39,0	—	+++	+	23	19	++	++	++	++	—	—
12	1951	19,0	—	—	—	38	34	—	—	++	++	+	+

e de maior intensidade de cor, como ++ as manchas de dimensão média e como + as manchas de pequena dimensão e de média intensidade de cor existentes nos cromatogramas de N.º 19 a N.º 30 e cujos valores estão representados no Quadro XII.

Por este quadro verificámos ser quantitativamente mais importante a cianidina e também que aquela apresenta menores variações no decurso do envelhecimento. A petunidina e a peonidina desapareceram ao fim de cinco anos, notando-se todavia um comportamento irregular da delfinidina e malvidina, ao fim do mesmo período, embora revelassem uma certa tendência para se eliminarem.

Nesse quadro também estão expressos os valores obtidos para a determinação percentual dos compostos fenólicos totais pelo índice de permanganato, valores estes que nos dão a ideia de existir uma tendência para decrescerem com o envelhecimento, notando-se contudo a existência de valores substancialmente baixos nas amostras N.º 9 e N.º 12 que apresentam sem dúvida características de serem as mais envelhecidas.

### 9 — DISCUSSÃO E CRÍTICA

A análise organoléptica das amostras já permite apreciar a evolução da cor do vinho, persistência da espuma assim como do aroma e sabor. Com efeito as amostras mais novas apresentam cor granada, espuma rosada e fugaz, aroma vinoso, passando com a idade a ter cor rubi, espuma persistente e esbranquiçada, aroma particular, finalizando numa cor tijolo com um agradável aroma a velho. Por outro lado, quanto ao sabor notamos uma certa uniformidade na doçura e acidez em contraste com a adstringência que de taninosa passa a macia, finalizando em aveludada, assim como uma evolução no corpo, que de encorpado passa a leve. Tais elementos dizem-nos que o vinho a partir de quatro anos apresenta aroma particular agradável, que não conseguimos definir, e que encontramos igualmente em amostras envelhecidas do vinho Dão, assim como um sabor macio, melhorando sempre com a idade, não nos sendo possível determinar em função das amostras existentes o começo da degradação do vinho (MILISAVLJEVIC, 1965). Para interpretar tais evoluções recorreremos aos métodos

de referência O. I. V. determinando assim as coordenadas da cor, assim como o comprimento de onda dominante e pureza, permitindo-nos verificar tendências do comprimento de onda para diminuir e da pureza para aumentar com o envelhecimento. Em trabalho anterior (ESTEVES-PINTO, 1969) igualmente verificamos uma evolução da tonalidade do vinho que de vermelha finaliza no caso estudado em laranja avermelhada.

E é com efeito a tonalidade, no referente à cor, que nos dá melhores indicações quanto ao grau de evolução dum vinho. De facto a tonalidade Sudraud das amostras recentes, que na apreciação organoléptica foram caracterizadas como possuindo cor granada, possui valores inferiores à unidade, aumentando este valor com o envelhecimento à medida que as amostras assumem características organolépticas de mais envelhecidas. Este dado é ainda mais notório na tonalidade definida pelo método rápido O. I. V. pois os valores positivos do ângulo vão diminuindo para tomarem valores negativos, valores estes que vão aumentando em valor absoluto com o envelhecimento. Tal observação deve-se, a que estes índices são a relação entre as absorvências a 420 e 520 nm que correspondem respectivamente à cor amarela e vermelha, tudo se passando portanto como se a cor vermelha diminuísse em relação à amarela.

Por outro lado sabemos que as antocianinas são os pigmentos vermelhos do vinho e HUMBERTO DE ALMEIDA (1960) ao fazer estudos sobre o depósito formado ao longo do envelhecimento do vinho do Porto, verificou que a criação deste, se traduz por um fenómeno da química coloidal sendo constituído essencialmente por matéria corante formada principalmente pelos derivados da malvidina, sobretudo enina, e talvez da delfinidina e peonidina. Nós verificámos tal evolução no vinho, pois o quantitativo antociânico diminui de cerca de metade do seu valor do primeiro para o segundo ano e deste para o quarto também cerca de metade havendo uma tendência para a diminuição deste valor ao longo do envelhecimento.

Ainda pelo Quadro XII verificamos que as antocianidinas obtidas por hidrólise ácida do vinho diminuem com o envelhecimento, mantendo-se unicamente numa forma mais ou menos regular a cianidina. E muito embora esta permanência da cianidina se deva explicar talvez por ser a antocianidina mais simples e resistir melhor à degradação, ou ainda por resultar

da transformação pelo aquecimento em meio ácido das flavanas-3,4-diol em antocianidina (pois a 5:7:3':4'-tetrahidroxiflavana-3,4-diol é a flavana-3,4-diol mais comum e que origina por este tratamento a cianidina) é facto verificado que a matéria corante vermelha diminui com o envelhecimento.

Assim como diz RIBÉREAU-GAYON & STONESTREET (1966) os pigmentos responsáveis pela cor vermelha dos vinhos vão desaparecendo com a idade, dando origem a uma maior participação dos taninos na cor do vinho, que sendo incolores ou amarelados permitem concluir da importância da tonalidade como índice avaliador da evolução que um vinho sofre com o envelhecimento.

Por sua vez verificámos o comportamento das três agluconas flavonois (miricetina, quercetina e campferol) tendo constatado que o desaparecimento se verifica pela seguinte ordem: miricetina, depois campferol, e finalmente a quercetina nas amostras dos vinhos que na prova organoléptica foram classificadas como tendo cor tijolo e aroma a velho. Igualmente é fácil verificar pelo Quadro XII um paralelismo entre o desaparecimento das antocianidinas obtidas por hidrólise ácida do vinho e as agluconas flavonois, traduzindo-se o desaparecimento das agluconas flavonois pela perda da riqueza vitamínica P e provavelmente com influência na cor do vinho. Continuando a nossa tentativa de relacionar as características organolépticas e sua evolução com os resultados obtidos, verificamos uma certa relação entre tais características e o valor de índice de permanganato.

Assim não considerando a amostra N.º 6 por ter sido classificada como «chata» na acidez, o que deve ter interferido na apreciação da adstringência, verificámos que para valores iguais ou superiores a 47 do índice de permanganato, corresponde adstringência taninosa, para valores inferiores a 47 adstringência pouco taninosa ou macia sendo aveludada para o valor mais baixo deste índice. Igualmente com o envelhecimento a adstringência que é nos vinhos novos taninosa, passa com a idade a macia finalizando em aveludada. A explicação deste fenómeno deve-se talvez à diminuição da riqueza tânica do vinho. Com efeito, os precursores dos taninos por intermédio dum complicado processo de polimerização originam os oligómeros, de propriedades fortemente tânicas, originando por

continuação deste processo formas fortemente polimerizadas que vão perdendo a propriedade de se unirem às proteínas com o aumento do seu peso molecular, podendo mesmo insolubilizar-se.

Este comportamento foi sumariamente tratado com a determinação do índice de permanganato visto dar-nos uma ideia da totalidade dos compostos fenólicos. A diminuição do valor do índice de permanganato com o envelhecimento está todavia em aparente contradição com os resultados obtidos por RIBÉREAU-GAYON (1964b). Mas tal aparente incongruência, explica-se porque no dizer do autor, as suas análises foram efectuadas em vinhos sujeitos a técnicas de vinificação variáveis que permitem por desengace e por redução do tempo da curtimenta, obter vinhos cada vez mais macios e menos ricos em compostos fenólicos. Ora as determinações por nós efectuadas incidiram sobre amostras de colheitas de diferentes anos mas obtidas pelo mesmo processo tecnológico de vinificação, devendo-se a tal facto a diferença de valores obtidos. Por isso mantemos nós que o valor de tal índice diminui com o envelhecimento desde que as amostras sejam obtidas pelo mesmo processo tecnológico.

## 10 — CONCLUSÕES

### 1) Quanto à prova:

- a) A cor inicialmente granada, passa na generalidade, ao fim de 6 a 8 anos a rubi e acaba por ser tijolo nas amostras mais envelhecidas.
- b) O aroma é inicialmente vinoso, passa ao fim de 2 a 4 anos a «particular» e apresenta-se ao fim de 11 a 12 anos característico a envelhecido.
- c) A espuma, inicialmente rosada, passa ao fim de 6 a 8 anos a esbranquiçada, notando-se um paralelismo entre as características da espuma e a cor do vinho.
- d) A adstringência, inicialmente taninosa, evolui para macia e algumas vezes para aveludada.
- e) O vinho, inicialmente encorpado, passa a leve com o envelhecimento.

### 2) Quanto à determinação das características cromáticas:

- a) O comprimento de onda dominante, definido pelo método de referência O. I. V., baixa rapidamente apresentando comportamento irregular nos vinhos com mais de 4 anos de idade.
- b) A pureza da cor, definida pelo método de referência O. I. V., tem tendência a aumentar com o envelhecimento.
- c) O valor da tonalidade, definido pelo método rápido O. I. V. diminui com o envelhecimento. Inicialmente o seu valor expresso em ângulo é positivo, diminui o seu valor com o envelhecimento, passando a negativo. Este valor negativo nas amostras envelhecidas vai aumentando em valor absoluto ao longo do envelhecimento.
- d) O valor da tonalidade, definido por SUDRAUD, aumenta com o envelhecimento.

### 3) Quanto aos compostos fenólicos:

- a) O índice de permanganato, que nos dá uma ideia da totalidade dos compostos fenólicos, tem tendência a diminuir com o envelhecimento.
- b) As agluconas flavonois desaparecem com o envelhecimento. A miricetina desaparece ao fim de 6 anos. O campferol, a partir de 11 anos tem tendência a desaparecer, e a quercetina, que existe nestes vinhos em quantidade superior à das outras agluconas flavonois, está também ausente nas amostras que, na prova organoléptica, foram qualificadas como tendo cor tijolo.
- c) As antocianinas diminuem com o envelhecimento. O seu quantitativo diminui de cerca de metade do primeiro para o segundo ano e também de cerca de metade do segundo para o quarto ano.
- d) As antocianidinas consideradas no presente trabalho, quer sejam as obtidas por hidrólise das antocianinas quer as resultantes das flavanas-

-3,4-diol, por aquecimento em meio ácido, comportam-se da seguinte forma:

- a cianidina mantém-se ao longo do envelhecimento numa forma mais ou menos regular;
- a petunidina desaparece ao fim de 4 a 6 anos;
- a peonidina desaparece ao fim de 6 a 8 anos;
- a malvidina e delphinidina apresentam comportamento irregular a partir dos 6 a 8 anos com tendência para desaparecerem.

### RÉSUMÉ

On sait que les composés polyphénoliques exercent une grande influence sur les propriétés organoleptiques d'un vin.

Nous nous proposons d'étudier l'évolution des composés polyphénoliques du vin, ainsi que les propriétés organoleptiques influencées par eux d'une manière décisive, et d'établir les relations caractéristiques qui se produisent au cours du phénomène du vieillissement.

Les échantillons analysés sont de la Cave Coopérative de Fundão et proviennent de récoltes successives, à partir des mêmes vignobles, et ont été obtenus par le même procédé technologique.

L'analyse organoleptique a été effectuée suivant les normes de la Junte Nationale du Vin et nous avons constaté que le vin, initialement grenat, prenait au bout de 6 à 8 ans une couleur de rubis, pour finir par avoir une couleur de brique, dans les échantillons les plus vieux. L'arôme est initialement vineux et, au bout de 2 à 4 ans, devient «particulier», et «vieux» au bout de 11 à 12 ans. L'écume, rosée dans les échantillons récents, devient blanchâtre au bout de 6 à 8 ans, et l'on note un parallélisme entre les caractéristiques de l'écume et la couleur du vin. L'astringence, initialement tannique, évolue pour devenir douce, et parfois même veloutée. Le vin est initialement corsé, puis devient léger avec le vieillissement.

La détermination des caractéristiques chromatiques nous a permis d'observer que la longueur d'onde dominante, définie par la méthode de référence O. I. V. baisse rapidement, accusant

un comportement irrégulier dans les vins de plus de 4 ans, et que la pureté de la couleur a tendance à augmenter avec le vieillissement. La nuance définie par la méthode rapide O. I. V. diminue avec le vieillissement. Sa valeur exprimée en angle est initialement positive et diminue avec l'âge pour atteindre des valeurs négatives. Cette valeur négative dans les échantillons vieillis augmente progressivement, en valeur absolue, avec le temps. La nuance Sudraud augmente avec le vieillissement.

Pour l'étude des aglycones flavonols nous avons utilisé la technique de la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. Nous avons procédé à une extraction au préalable de ces composés avec de l'acétate d'éthyle et nous avons utilisé, comme premier solvant la phase inférieure du mélange alcool isoamylique - acide acétique - hexane - eau distillée (3 + 1 + 3 + 3, en volume) et, comme second solvant, la phase supérieure du mélange alcool amylique tertiaire - eau distillée (1 + 1, en volume).

Le support a été la cellulose Whatman CC41. Nous avons constaté par ce procédé que les aglycones flavonols disparaissent avec le vieillissement. La myricétine disparaît au bout de 6 ans. Le kaempférol a tendance à disparaître à partir de 11 ans. La quercétine qui, dans le cas étudié, existe en quantité supérieure à celle des autres aglycones flavonols, est également absente dans les échantillons qui, à l'épreuve organoleptique, ont été classés comme «couleur brique».

L'étude des anthocyanines a été effectuée par les méthodes du pH et du bisulfite de sodium. Leur quantité diminue de moitié environ de la première à la deuxième année, et de moitié environ également, de la seconde à la quatrième année.

L'étude des anthocyanidines obtenues par hydrolyse acide du vin a été effectuée par la technique de la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. Comme premier solvant nous avons utilisé le «Forestal» et comme second solvant la phase supérieure du mélange n-butanol - acide chlorhydrique 2N (1+1, en volume). Le support a été la cellulose Whatman CC41. Nous avons constaté par ce procédé que la cyanidine se maintient au long du vieillissement d'une manière plus au moins régulière. La pétunidine disparaît au bout de 4 a 6 ans, la paeonidine disparaît au bout de 6 a 8 ans, tandis que la malvidine et

la delphinidine accusent des comportements irréguliers à partir de 6 à 8 ans avec tendance à disparaître.

La détermination de l'indice de permanganate nous a permis d'observer que sa valeur à tendance à diminuer avec le vieillissement.

### AGRADECIMENTOS

Ao Engenheiro ISIDORO DE OLIVEIRA COSTA NETTO pelas facilidades que nos concedeu com vista à realização do trabalho.

Ao Engenheiro PEDRO MANSO LEFÈVRE que o corrigiu criticamente tornando possível a sua publicação.

Ao Engenheiro JÚLIO MANUEL LOPES RODRIGUES pelos inestimáveis ensinamentos que sempre nos proporcionou.

### BIBLIOGRAFIA

- ALBUQUERQUE, J. DE PINA MANIQUE  
1954 *Carta Ecológica de Portugal*, Ministério da Economia. Direcção-Geral dos Serviços Agrícolas, Lisboa.
- ALMEIDA, HUMBERTO DE  
1960 Antocianosídeos. Principais responsáveis pela formação de depósitos durante o envelhecimento do vinho do Porto (tinto). *Anais I. V. P.* 18: 1-43.
- ASEN, S.  
1965 Preparative thin-layer chromatography of anthocyanins. *J. Chromatog.* 18: 602-603.
- BATE-SMITH, E. C.  
1963 Paper chromatography of phenolics, in *Methods in polyphenol chemistry*: 73-79. Pridam J. B. ed., Pergamon Press, Oxford.
- BAYER, E.  
1959 Über Anthocyan Komplexe. Farbstoffe der roten, violetten und blauen Lupinenblüten. *Chem. Ber.* 92: 1062-1971.
- BHANDARI, P. R.  
1964 Identification of flavonoids in hops (*Humulus lupulus* LINNE) by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 16: 130-135.
- BIOL, H.; FOULONNEAU  
1961 Le paeonidol 3,5-diglucoside dans le genre *Vitis*. *Ann. Technol. agric.* 10 (4): 345-350.
- BIOL, H.; MICHEL, A.  
1961a Chromatographie sur papier des matières colorantes des vins rouges. *Ann. Technol. agric.* 10 (4): 319-324.  
1961b Techniques chromatographiques appliquées à la différenciation des matières colorantes des vins rouges. *Ann. Technol. agric.* 10 (4): 325-337.

- 1961c Étude chromatographique des vins rouges issus de cépage réglementés. *Ann. Technol. agric.* 10 (4): 339-344.
- BOUBALS, M. M. D.; CORDONNIER, R. & PISTRE, R.  
1962 Étude du mode de transmission héréditaire du caractère «diglucosides anthocyaniques des baies» dans le Genre *Vitis*. *C. R. Ac. Agri.* 48: 201-203.
- BOURZEIX, M. & BANIOL, P.  
1966 L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.* 15 (2): 211-217.
- CONRADIE, J. D. & NEETHLING, L. P.  
1968 A rapid thin-layer chromatographic method for the anthocyanins in grape varieties. *J. Chromatog.* 34: 419-420.
- COSTA, ALÓISIO FERNANDES  
1967 *Farmacognosia*. Volume II. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- COULSON, C. B. & EVANS, W. C.  
1958 Paper chromatography and paper electrophoresis of phenols and glycosides. *J. Chromatog.* 1: 374-379.
- DEIBNER, L.  
1968 Sur la séparation du paeonoside et du malvoside au moyen de la chromatographie sur papier et sur couche mince de cellulose. *J. Chromatog.* 34: 425-427.
- DEIBNER, L. & BOURZEIX, M.  
1963 Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.* 12 (4): 287-312.  
1964 Recherches sur la détection des anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin (par chromatographie sur papier et fluoriscopie des taches obtenues). *Ann. Technol. agric.* 13 (3): 263-282.  
1965 Détection des anthocyanes diglucosides dans les vins rouges à l'aide de l'oencapillarographie. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 58 (665): 107-110.
- DEIBNER, L.; BOURZEIX, M. & CABIBEL-HUGUES, M.  
1964 La séparation des anthocyanes diglucosides par chromatographie sur couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.* 13 (4): 359-378.
- DORIER, P. & VERELLE, L. P.  
1966 Nouvelle méthode de recherche des glucosides anthocyaniques dans les vins. *Ann. Fals. Exp.* 59 (669): 1-10.
- EGGER, KURT  
1961 Zur chromatographie von flavonolen im fließmittelsystem chloroform-eisessig-wasser. *J. Chromatog.* 5: 74-81.
- ESTEVEZ-PINTO, J. M. R.  
1969 *Envelhecimento do vinho. Compostos fenólicos e sua evolução. Estudo efectuado em vinhos da Adega Cooperativa do Fundão. Relatório final do Curso de Engenheiro Agrônomo.* Lisboa.

- FERNANDES, ANTÓNIO MANUEL SEBASTIÃO SILVA  
 1958 *Antocianinas das uvas e dos vinhos*. Relatório Final do Curso de Engenharia Agrônomo. Lisboa.
- FERRÃO, JOSÉ EDUARDO MENDES  
 1963 Cacaos de S. Tomé e Príncipe. Dos polifenóis durante a fermentação. *Ann. Inst. Sup. Agron.* 25: 17-219.
- FREUDENBERG, K. & WEINGES, K.  
 1962 Catechins and flavonoid tannins, in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A. ed.: 197-216. New York, Perg. Press.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J.  
 1967 A new developing solvent for paper chromatography of various phenolic compounds, sugars and amino acids. *J. Chromatog.* 26: 404-411.
- GIRÃO, ARISTIDES DE AMORIM  
 1941 *Atlas de Portugal*. Coimbra.  
 1960 *Geografia de Portugal*. Portucalense Editora. Porto.
- GOMES, B.  
 1878 *Cartas elementares de Portugal para uso das escolas*. Lallemand Frères Typ. Lisboa.
- GRIPENBERG, J.  
 1962 Flavones, in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A. ed.: 406-440. New York, Perg. Press.
- GUPTA, S. B.  
 1968 Thin-layer chromatographic separation of anthocyanins and anthocyanidins in *Medicago* (Papilionaceae). *J. Chromatog.* 36: 115-119.
- HARBORNE, J. B.  
 1958 The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatog.* 1: 473-488.  
 1959 Chromatographic identification of anthocyanin pigments. *Chromatographic reviews*. 1: 209-224, Lederer, M. ed. Elsevier Publishing Company. New York.  
 1960 The chromatography of the flavonoid pigments. *Chromatographic reviews*. 2: 105-128, Lederer, M. ed. Elsevier Publishing Company. New York.
- HAYASHI, K.  
 1962 The anthocyanins. in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A.: 248-285. N. Y. Perg. Press.
- JAULMES, M. M. & NEY  
 1960 Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 53 (616): 180-184.
- JOHNSTON, K. M.; STERN, D. J. & WAISS, JR. A. C.  
 1968 Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20. *J. Chromatog.* 33: 539-541.
- LEFÈVRE, PEDRO MANSO  
 1966 Determinação do diglucósido-malvosido em vinhos. Estudo comparativo de alguns métodos de cromatografia em papel. *Vin. Port. Doc. Série II*, 3: 1-35.

- LENCASTRE, ANTÓNIO QUEIROZ DE VASCONCELOS E  
 1940 Considerações sobre taninos e sua determinação nos vinhos do Porto. *Anais I. V. P.* 1: 203-289.
- LIMA, ANTÓNIO DOS SANTOS MARTINS  
 1956 *Proteínas e aminoácidos de trigos portugueses*. Relatório final do Curso de Engenharia Agrônomo. Lisboa.
- MATHERS, A. P.  
 1951 Report on chromatographic studies of wines and distilled spirits. *Journal of the A. O. A. C.* 34 (2): 307-309.
- MILISAVLJEVIC, D.  
 1965 Phénomènes d'oxydo-reduction au cours de la maturation et du vieillissement du vin et procédés pour les modifier. *Bulletin d'O. I. V.* 38 (417): 1280-1285.
- MORITA, KATSURA & HARUTA, FUJICO  
 1963 A spraying method for the preparation of thin-layer chromatoplates. *J. Chromatog.* 12: 412.
- MORTON, A. D.  
 1967 Thin-Layer chromatography of anthocyanins from blackcurrant juice. *J. Chromatog.* 28: 480-481.
- MULLICH, D. B. & BRINK, V. C.  
 1967 Solvents for anthocyanidin chromatography. *J. Chromatog.* 28: 471-474.
- O. I. V.  
 1962-1970 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Office International de la Vigne et du Vin. Paris.
- PUISSANT, A. & LÉON, HUGUETTE  
 1967 La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Ann. Technol. agric.* 16 (3): 217-225.
- RANDERATH, KURT  
 1966 *Thin-layer chromatography*. Verlag Chemie. GmbH. Weinheim/Bergstr Academic Press. New York.
- RIBÉREAU-GAYON, J. & PEYNAUD, E.  
 1966 *Traité d'oenologie*. Librairie Polytechnique Beranger. Dunod. Paris. Tome-second.
- RIBÉREAU-GAYON, P.  
 1957a Le leucocyanidol dans les vins rouges. *C. R. Ac. Agri.* 11: 197-199.  
 1957b Le leucocyanidol dans les vins rouges: Observations complémentaires. *C. R. Ac. Agri.* 11: 596-598.  
 1959 *Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au Genre Vitis*. Librairie Generale. Paris.  
 1963 Les anthocyanes des fruits: Méthodes d'identification et applications. *Mises au Point de Chimie Analytique Organique. Pharmaceutique et Bromotologique*. Onzième Série. Masson Cie. Paris: 189-220.  
 1964a Les flavonosides de la baie dans le genre Vitis. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 258: 1335-1337.

- 1964b *Les composés phénoliques du raisin et du vin*. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.
- 1965 La couleur des vins. *Bulletin de la Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire de l'Association Française des Techniciens de l'Alimentation Animale et de l'Association Française de Zootechnie*. 53: 222-248.
- 1968a *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod. Paris.
- 1968b Étude Scientifique et technique des composés phénolique en oenologie. *Revista de Horticultură si Viticultură*. Bucarest: 267-274.
- ? *Les composés phénoliques du raisin et du vin*. (Dactilografado). Laboratório d'Enologie et Chimie Agricole, Faculté des Sciences de Bordeaux.
- RIBÉREAU-GAYON, P. & NEDELTCHEV, N.
- 1965 Discussion et application des méthodes modernes de dosage des anthocyanes et des tanins dans les vins. *Ann. Technol. agric* 14 (4): 321-330.
- RIBÉREAU-GAYON, P. & STONESTREET, E.
- 1964 La constitution des tanins du raisin et du vin. *C. R. Ac. Agri.*: 662-670.
- 1965 Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*: 2649-2652.
- 1966 Dosage des tanins du vin et détermination de leur structure. *Chim. Analy.* 48 (4): 188-196.
- ROUX, D. G. & EVELYN, S. R.
- 1958 The correlation between structure and paper chromatographic behaviour of some flavonoid compounds and tanins. *J. Chromatog.* 1: 537-544.
- SEIKEL, M. K.
- 1962 Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds, in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A. ed.: 34-70. New York, Perg. Press.
- SESHADRI, T. R.
- 1962 Isolation of flavonoid compounds from plant materials, in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A. ed.: 6-33. New York. Perg. Press.
- SHIMOKORSYMA, M.
- 1962 Flavanones, chalcones and aurones, in *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, T. A. ed.: 286-316, New York. Perg. Press.
- SMITH, I.
- 1960 *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Volume I. William Heiremann-Medical books. Ltd. Interscience Publishers inc. New York.
- STAHL, E.
- 1965 *Thin-layer chromatography*. Academic Press inc, Publishers. New York.

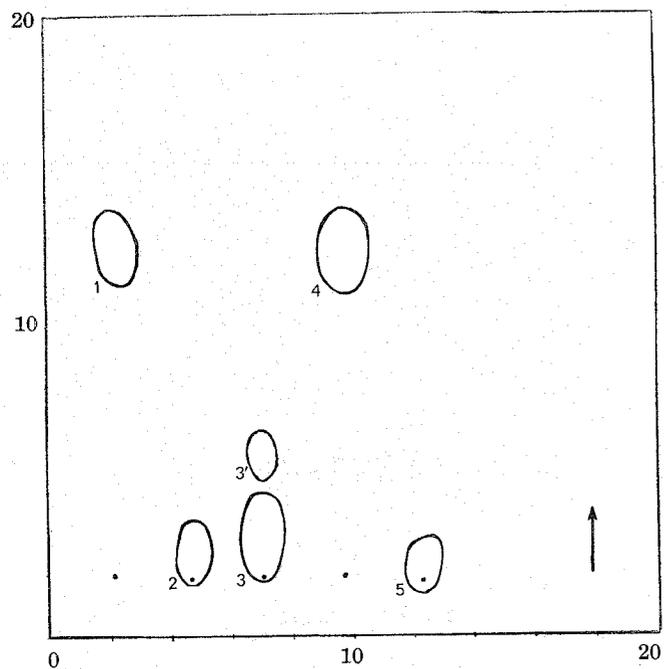
- STRAIN, H.
- 1945 *Chromatographic adsorption analysis*. Interscience Publishers, inc. New York.
- SUDRAUD, P.
- 1962 Mesure de la couleur des vins rouges. *F. V. de l'O. I. V.* N.° 109. 5/62.
- WONG, E. & TAYLOR, A. O.
- 1962 The chromatography of flavonoid aglycones in the solvent system benzene - acetic acid - water. *J. Chromatog.* 9: 449-454.

**APÊNDICE**

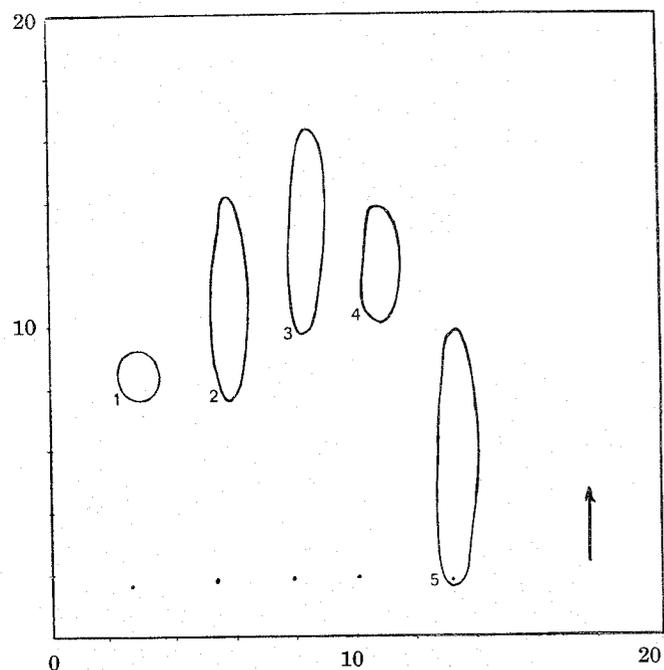
**I**

**FLAVONOIS**

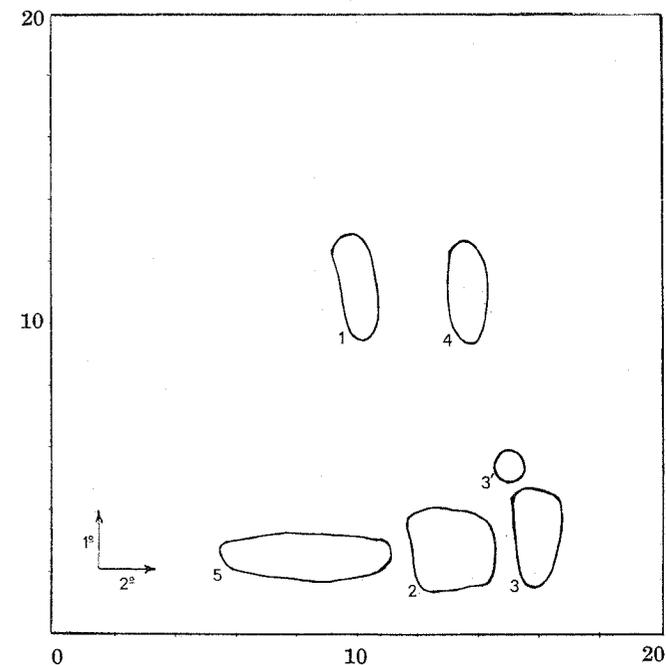
CROMATOGRAMA 1



CROMATOGRAMA 2



CROMATOGRAMA 3



LEGENDA DOS CROMATOGRAMAS 1 A 3

Cromatografia em camada fina.

Suporte: Celulose Whatman CC41. Espessura = 0,5 mm.

Cromatogramas monodimensionais de flavonóis puros (padrões).

*Cromatograma 1:*

Eluente: Fase inferior da mistura álcool isoamílico - ácido acético - hexano - água (3 + 1 + 3 + 3, em volume).

*Cromatograma 2:*

Eluente: Fase superior da mistura álcool amílico terciário - água (1 + 1, em volume).

Cromatografia bidimensional dos flavonóis puros (padrões).

*Cromatograma 3:*

Eluentes: 1.º — O do cromatograma 1.

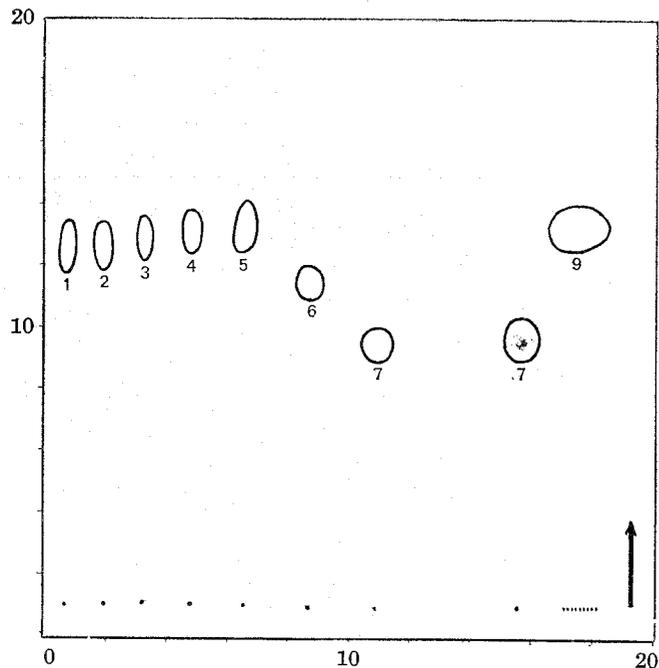
2.º — O do cromatograma 2.

Manchas:

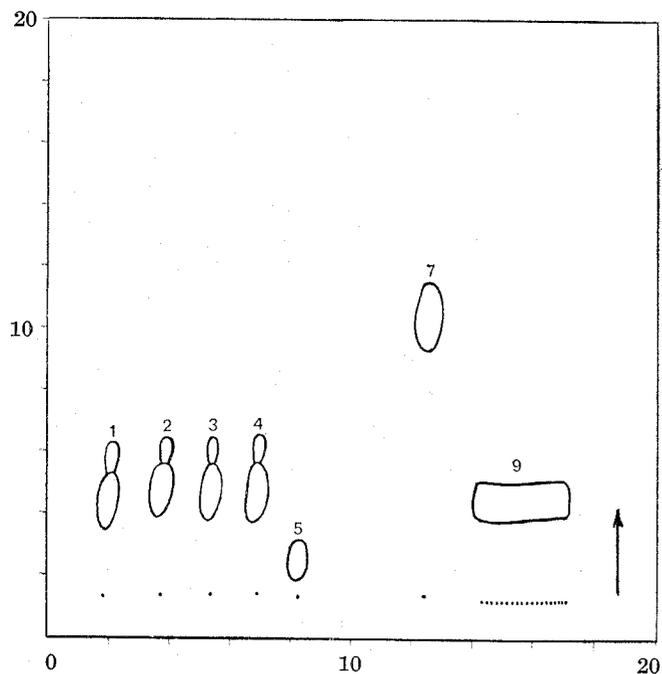
1 — Rutina; 2 — Quercetina; 3 e 3' — Campferol; 4 — Quercitrina;  
5 — Miricetina.

II  
ANTOCIANAS

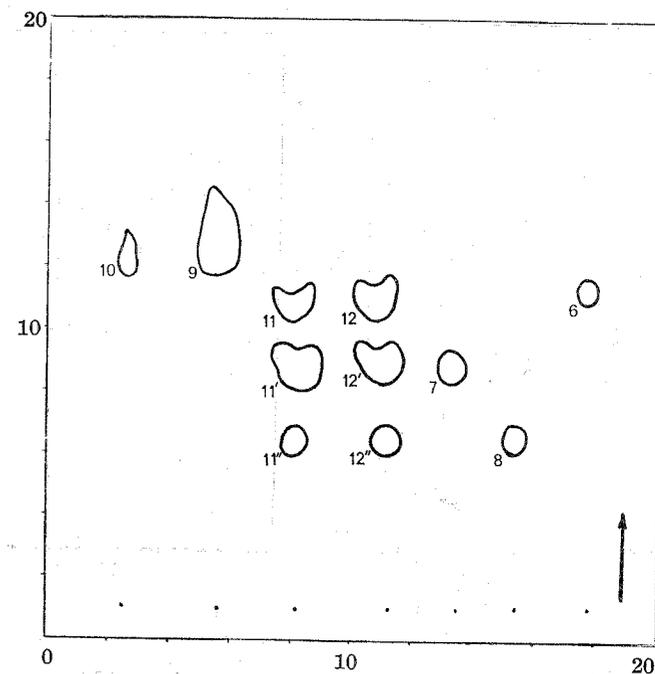
CROMATOGRAMA 16



CROMATOGRAMA 17



CROMATOGRAMA 18



LEGENDA DOS CROMATOGRAMAS 16 A 18

Cromatografia monodimensional em camada fina.  
Suporte: Celulose Whatman CC41. Espessura = 0,5 mm.

Eluentes:

*Cromatogramas 16 e 18* — «Forestal».

*Cromatograma 17* — Fase superior da mistura n-butanol - ácido clorídrico 2N (1 + 1, em volume).

Manchas:

Antocianinas isoladas das películas. Castas:

1 — *Bastardinho* (Cova da Beira); 2 — *Aramon* (Tapada da Ajuda); 3 — *Bastardo* (Cova da Beira); 4 — *Bastardo* (Douro).

Antocianina pura (padrão):

5 — Malvina (diglucósido).

Antocianidinas puras (padrões):

6 — Malvidina; 7 — Cianidina; 8 — Delfinidina.

Do desenvolvimento cromatográfico dum

9 — Vinho novo; 10 — Vinho velho; 11, 11', 11'' — Extracto amilico de vinho novo hidrolisado; 12, 12', 12'' — Extracto amilico de vinho velho hidrolisado.

TRABALHOS PUBLICADOS:

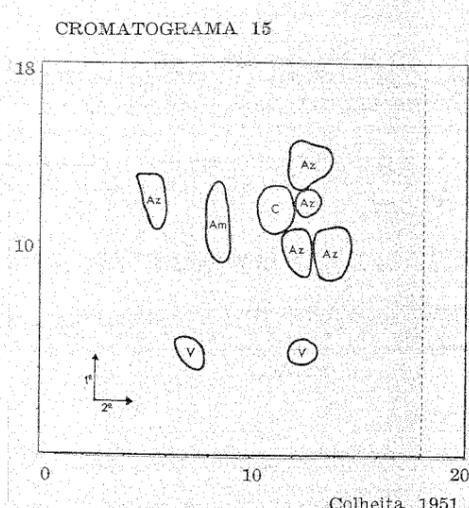
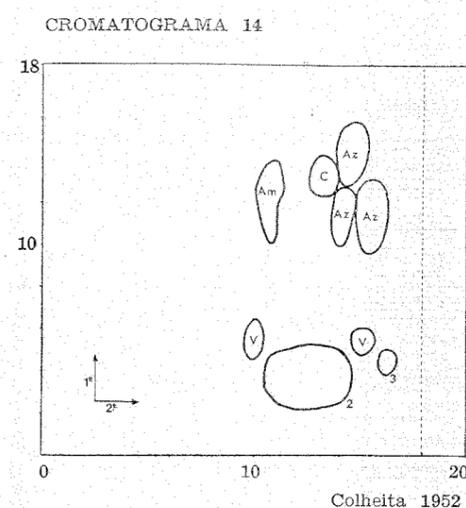
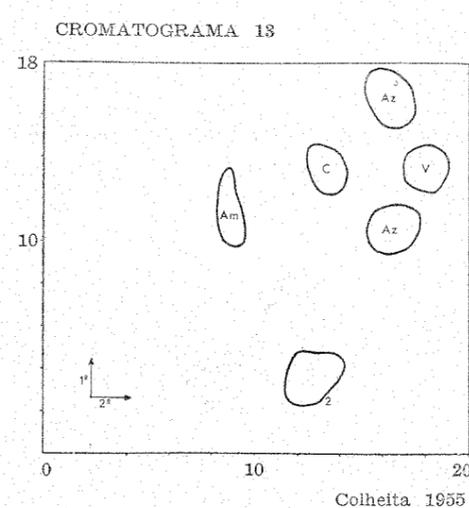
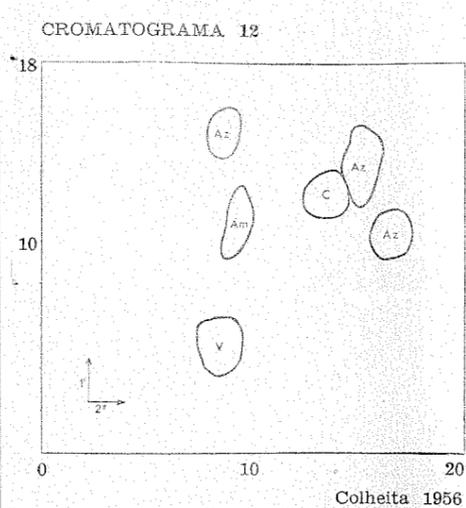
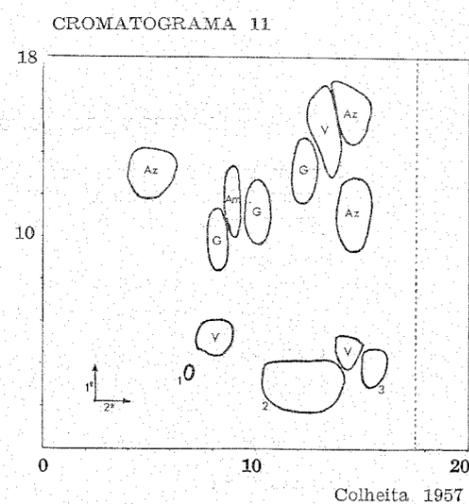
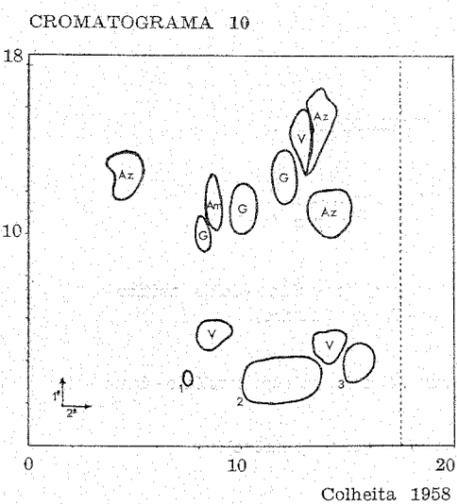
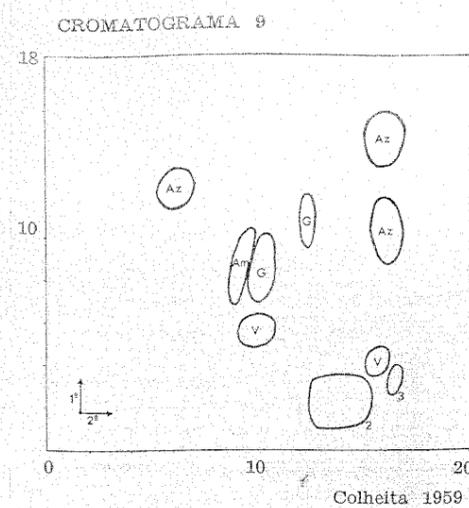
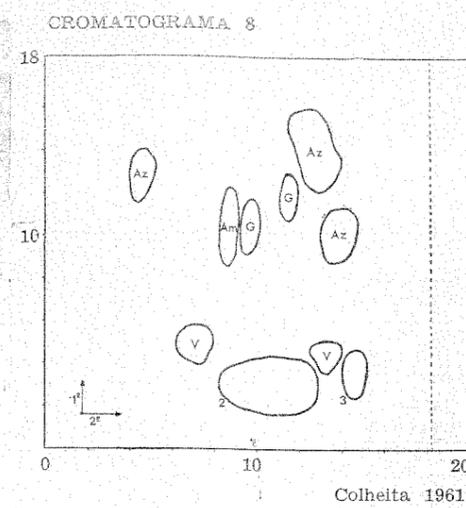
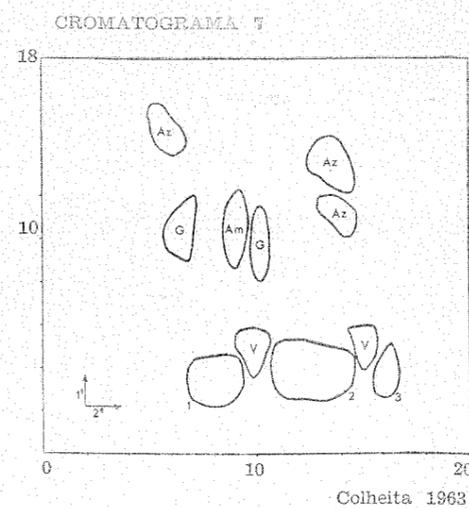
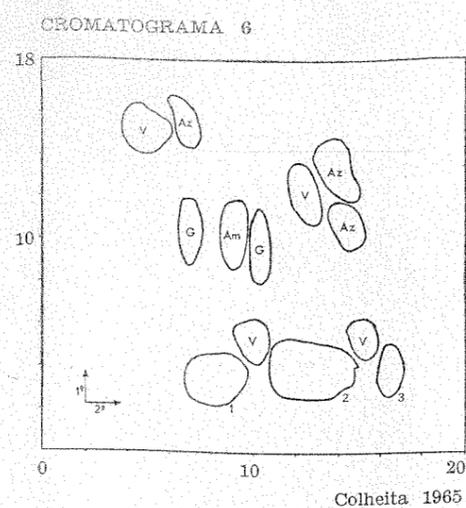
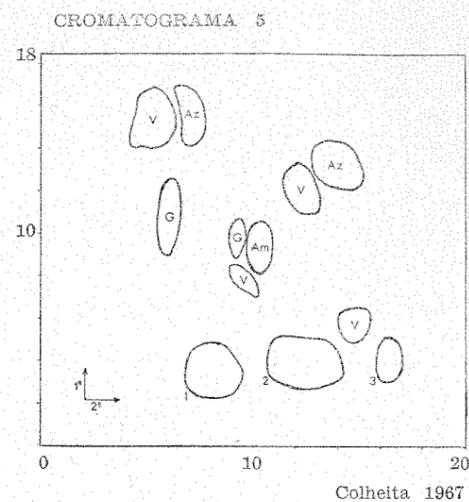
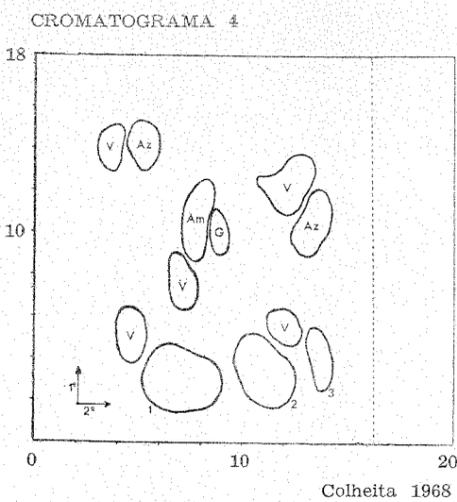
VOLUME V

Série I — VITICULTURA

- 1 . *Frazão, Amélia* — Eficácia e fitotoxicidade de fungicidas no tratamento do oídio da videira.
- 2 . *Martins, A. Lopes* — Melhoramento da videira. Métodos expeditos de avaliação das infecções do oídio sobre discos de folha destacada.

Série II — ENOLOGIA

- 1 . *Webb, A. Dinsmoor* — Gas-liquid chromatography and wine aroma.
- 2 . *Campos, Luís e Michel Severin* — Análise dos aminoácidos livres dos vinhos por cromatografia em fase gasosa.
- 3 . *Campos, Luís da Silva* — Nota sobre a diferenciação de aguardentes vinicas e de figo.
- 4 . *Belchior, A. Pedro, João F. A. C. Baptista e José Alberto R. San-*  
— Experimentação de máquinas na Adega Cooperativa de Vermelha. Vindima de 1969.
- 5 . *Pato, Manuel Augusto da Silva* — O gesso correção ácida dos mostos e dos vinhos.
- 6 . *Esteves-Pinto, J. M. R.* — Evolução de compostos polifenólicos no envelhecimento do vinho.



LEGENDA DOS CROMATOGRAMAS 4 A 15

Cromatogramas dos flavonóis do vinho extraídos com acetato de etilo.

Cromatografia bidimensional em camada fina.

Suporte : Celulose Whatman CC41. Espessura = 0,5 mm.

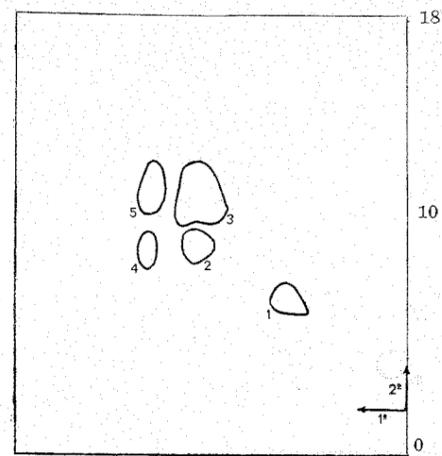
Eluentes: 1.º — Fase inferior da mistura álcool isoamílico - ácido acético - hexano - água (3 + 1 + 3 + 3, em volume).

2.º — Fase superior da mistura álcool amílico terciário - água (1 + 1, em volume).

Manchas: 1 — Miricetina; 2 — Quercetina; 3 — Campferol; G — Glucósido flavonol; Am — mancha amarela; Az — mancha azul; V — mancha violeta; C — mancha castanha-escura.

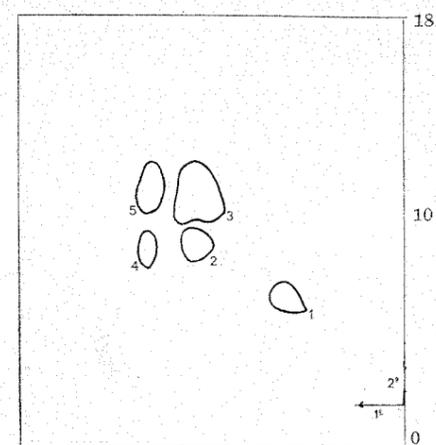
..... Frente do eluente.

CROMATOGRAMA 19



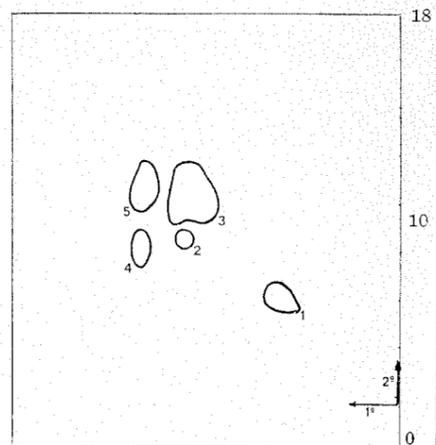
Colheita 1968

CROMATOGRAMA 20



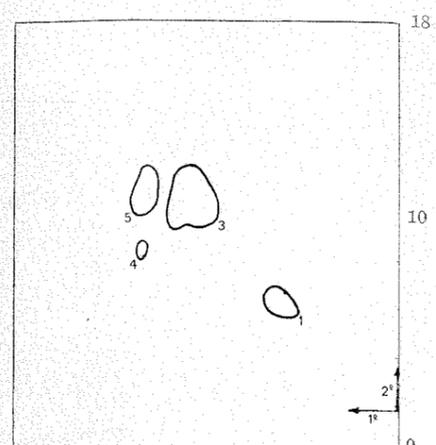
Colheita 1967

CROMATOGRAMA 21



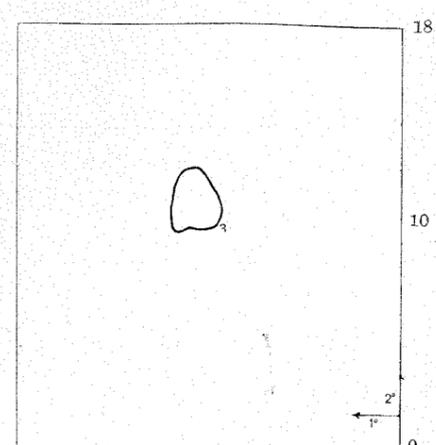
Colheita 1965

CROMATOGRAMA 22



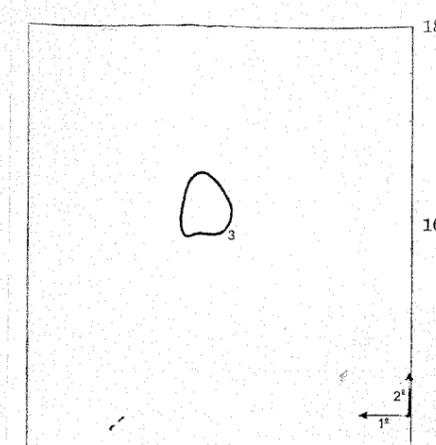
Colheita 1963

CROMATOGRAMA 23



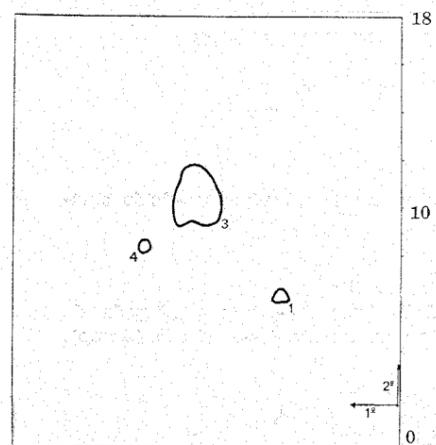
Colheita 1961

CROMATOGRAMA 24



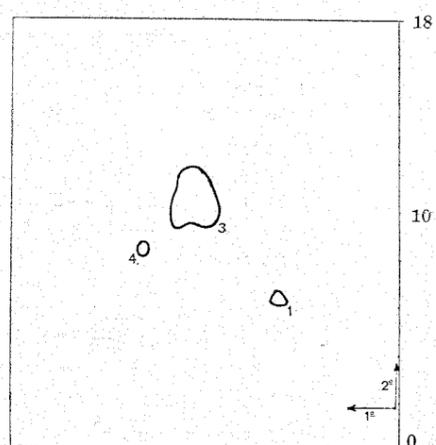
Colheita 1959

CROMATOGRAMA 25



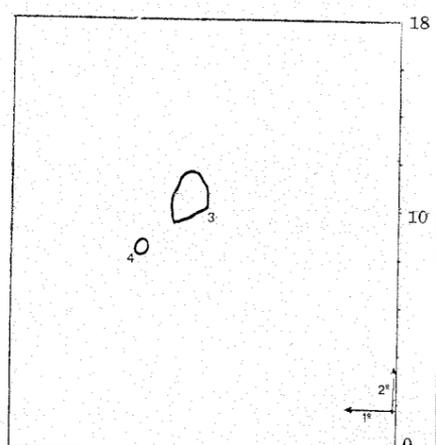
Colheita 1958

CROMATOGRAMA 26



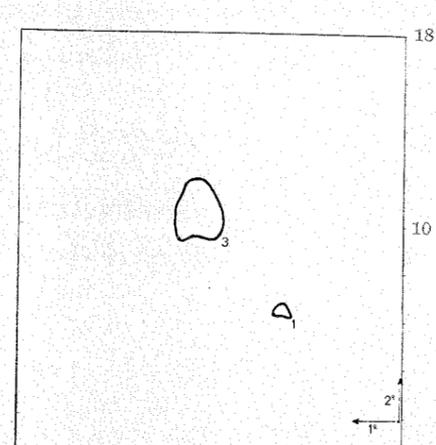
Colheita 1957

CROMATOGRAMA 27



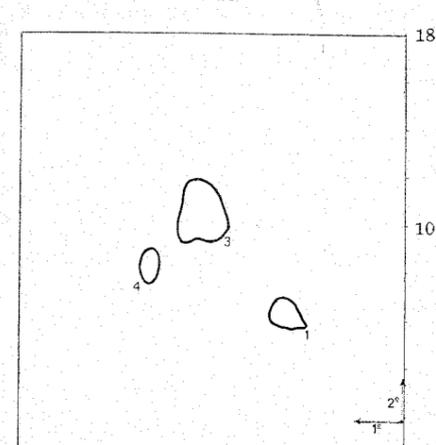
Colheita 1956

CROMATOGRAMA 28



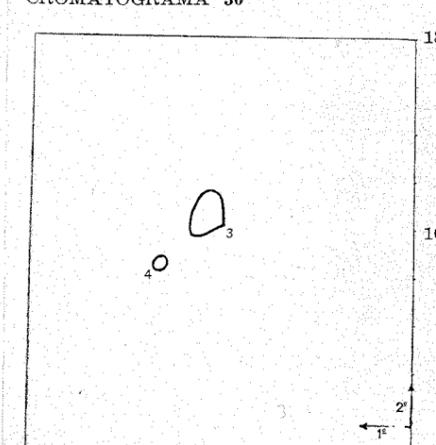
Colheita 1955

CROMATOGRAMA 29



Colheita 1952

CROMATOGRAMA 30



Colheita 1951

**LEGENDA DOS CROMATOGRAMAS 19 A 30**

**Cromatogramas das antocianidinas obtidas por hidrólise ácida do vinho.**

Cromatografia bidimensional em camada fina.

Suporte : Celulose Whatman CC41. Espessura = 0,5 mm.

Eluentes: 1.<sup>o</sup> — «Forestal»

2.<sup>o</sup> — Fase superior da mistura n-butanol-ácido clorídrico 2N (1 + 1, em volume).

Manchas: 1 — Delfinidina; 2 — Petunidina; 3 — Cianidina; 4 — Malvidina; 5 — Peonidina.

QUADRO VII

N.º da amostra	Ano da colheita	Cor	Aspecto			Cheiro	Sabor			
			Limpidez	Espuma			Doçura	Acidez	Adstringência	Corpo
				Cor	Persistência					
1	1968	granada	regularmente límpido	rosada	fugaz	vinoso	meio seco	normal	taninoso	encorpado
2	1967	granada	regularmente límpido	rosada	fugaz	vinoso	meio seco	normal	taninoso	encorpado
3	1965	granada	regularmente límpido	rosada	persistente	particular	meio seco	normal	macio	encorpado
4	1963	granada	regularmente límpido	rosada	persistente	particular	meio seco	normal	macio	encorpado
5	1961	rubi	límpido e brilhante	esbranquiçada	persistente	particular	meio doce	chato	taninoso	leve
6	1959	rubi	límpido e brilhante	esbranquiçada	persistente	acentuadamente particular	meio seco	chato	adstringente	leve
7	1958	granada	opalino	rosada	fugaz	particular	seco	normal	taninoso	encorpado
8	1957	granada	opalino	rosada	persistente	um pouco a velho	meio seco	normal	taninoso	encorpado
9	1956	tijolo	regularmente límpido	esbranquiçada	um pouco fugaz	a velho	meio seco	normal	aveludado	leve
10	1955	rubi	regularmente límpido	esbranquiçada	fugaz	um pouco a velho	meio seco	normal	um pouco taninoso	leve
11	1952	granada	regularmente límpido	rosada	persistente	particular	seco	normal	macio	leve
12	1951	tijolo	regularmente límpido	esbranquiçada	fugaz	a velho	meio seco	normal	um pouco taninoso	levemente encorpado

## ERRATA

PÁG.	LINHA	ONDE SE LÊ	DEVE LER-SE
9	19	porém tomar	porém que tomar
25	29	hidrolizadas	hidrolisadas
34	35	próximas que	próximas das que
46	Quadro VIII	dominante mm	dominante nm
51	6	também que aquela	também a que