



Ana Sofia Mataloto Falé

Licenciada em Bioquímica

**Estabilidade proteica, tartárica e corante
em vinhos: Implementação de metodologias
de análise**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof.^a Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Eng.^a Raquel Maria Da Cruz Raposo Neto
Loureiro, Responsável da Qualidade, Casa Relvas

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Arguente(s): Prof. Doutor(a) Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Vogal(ais): Prof. Doutor(a) Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2019



Ana Sofia Mataloto Falé

Licenciada em Bioquímica

**Estabilidade proteica, tartárica e corante
em vinhos: Implementação de metodologias
de análise**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof.^a Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Eng.^a Raquel Maria Da Cruz Raposo Neto
Loureiro, Responsável da Qualidade, Casa Relvas

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Arguente(s): Prof. Doutor(a) Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Vogal(ais): Prof. Doutor(a) Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2019

Estabilidade proteica, tartárica e corante em vinhos: Implementação de metodologias de análise

“Estabilidade proteica, tartárica e corante em vinhos: Implementação de metodologias de análise” Copyright © 2019 de Ana Sofia Mataloto Falé, da Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, aos meus pais, irmã e avós por todo o apoio, paciência e ajuda ao longo de todo este percurso académico em que sempre acreditaram nas minhas capacidades.

Queria também deixar um agradecimento muito especial ao meu namorado, que esteve sempre ao meu lado para me dar apoio e incentivo para continuar esta caminhada. Obrigada pelas palavras de carinho, compreensão e por todo o amor.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, um muito obrigado por toda a ajuda prestada no desenvolvimento desta dissertação e pela motivação transmitida.

Não poderia deixar de agradecer também à Engenheira Raquel Neto, co-orientadora nesta dissertação, por me ter acolhido neste projecto. Obrigada pela disponibilidade, simpatia e ajuda ao longo deste estágio.

Por último, mas não menos importante, queria agradecer a todos os colaboradores da empresa Casa Relvas pela simpatia com que me receberam e pela ajuda dada sempre que foi necessário.

Resumo

A principal preocupação dos produtores de vinho é a qualidade do vinho que chega ao consumidor, que depende da cor, transparência e propriedades organolépticas. No armazenamento do vinho engarrafado, estes parâmetros podem sofrer alguma alteração inesperada e indesejável, como o aparecimento de precipitados ou turvação que consequentemente podem conduzir à rejeição do produto pelos consumidores.

Um dos defeitos mais comuns do vinho comercial é a turvação nos vinhos, devido à instabilidade proteica, tal como o aparecimento de precipitados e depósitos no fundo da garrafa causados pela instabilidade tartárica e corante.

Desta forma, os testes para avaliar a estabilidade de um vinho específico são muito importantes na prática industrial do quotidiano, para avaliar se um vinho pode-se tornar instável durante o armazenamento e determinar as quantidades necessárias de clarificante/estabilizante a aplicar a cada vinho, de forma a evitar essas instabilidades. Visto que industrialmente é necessário obter resultados rápidos, têm sido amplamente estudados novos métodos que permitam obter resultados fidedignos para esta determinação num curto espaço de tempo.

Neste trabalho foi realizado o estudo e implementação de metodologias de análise de estabilidade proteica, tartárica e corante dos vinhos que permitissem à Casa Relvas, obter autonomia nesta avaliação e reduzir os custos inerentes à subcontratação destes serviços.

Os resultados obtidos demonstraram que o método térmico em banho-maria a 80 °C com adição de tanino foi o que melhor se adequou para avaliar a estabilidade proteica.

Para avaliar a estabilidade tartárica no vinho, o método de mini-contacto permitiu uma análise quantitativa ao contrário dos outros métodos estudados fornecendo melhores resultados.

Na avaliação da estabilidade corante foi implementado o método de permanência no frio uma vez que a melhor forma para avaliar a estabilidade de um vinho, passa por induzir essa instabilidade de forma semelhante ao que acontece espontaneamente no vinho.

Palavras-Chave: Vinho, Estabilidade, Proteica, Tartárica, Corante, Qualidade

Abstract

The main concern of wine producers is the quality of the wine that reaches the consumer, which depends on color, transparency and organoleptic properties. In storage of bottled wine, these parameters may undergo some unexpected and undesirable changes, such as the appearance of precipitates or turbidity which may consequently lead to rejection of the product by consumers.

One of the most common defects of commercial wine is turbidity in wines, due to protein instability, as well as the appearance of precipitates and deposits in the bottom of the bottle caused by tartaric instability and dye.

In this way, tests to assess the stability of a specific wine are very important in everyday industrial practice to evaluate whether a wine can become unstable during storage and to determine the necessary amounts of clarifier / stabilizer to be applied to each wine, in order to avoid these instabilities. Since rapid results are industrially required, new methods have been extensively studied to allow reliable results to be obtained for this determination in a short period of time.

In this work the methodologies for the analysis of protein, tartaric and color stability of the wines that allowed the Casa Relvas obtaining autonomy in this evaluation and reducing the costs inherent to the subcontracting of these services were studied.

The results obtained demonstrated that the thermal method in water bath at 80 °C with addition of tannin was the one that was best adapted to evaluate the protein stability.

To assess the tartaric stability in the wine, the mini-contact method allowed a quantitative analysis unlike the other methods studied, providing better results.

In the evaluation of dye stability the cold stay method was implemented since the best way to evaluate the stability of a wine is to induce this instability in a similar way to what happens spontaneously.

Keywords: Wine, Stability, Protein, Tartaric, Color, Quality

Índice de Matérias

Capítulo I	1
1.1. A empresa “Casa Relvas”	1
1.2. O vinho: constituição e processo produtivo	3
1.3. Estabilidade Proteica.....	9
1.3.1. Métodos de avaliação da estabilidade proteica	12
1.3.2. Métodos de estabilização proteica	14
1.4. Estabilidade Tartárica.....	17
1.4.1. Métodos de avaliação da estabilidade tartárica	20
1.4.2. Métodos de estabilização tartárica	21
1.5. Estabilidade Corante	25
1.5.1. Métodos de avaliação da estabilidade corante	27
1.5.2. Métodos de estabilização corante.....	28
1.6. Objectivo.....	29
Capítulo II	31
2. Materiais e Métodos	31
2.1. Análise sumária dos vinhos.....	31
2.1.1. Determinação do Dióxido de Enxofre Livre e Total.....	31
2.1.2. Determinação da Acidez Volátil	32
2.1.3. Determinação da Acidez Total	33
2.1.4. pH	33
2.1.5. Título Alcoométrico Volúmico Adquirido.....	33
2.1.6. Açúcares: Glucose-Frutose	33
2.1.7. Ácido L-Málico	34
2.1.8. Cor	34
2.2. Avaliação da Estabilidade Proteica	34
2.2.1. Sistema Bentocheck.....	35
2.2.2. Banho-maria	35
2.3. Avaliação da Estabilidade Tartárica	36
2.3.1. Teste de permanência no frio.....	36

2.3.2.	Teste mini-contacto	36
2.4.	Avaliação da Estabilidade Corante	37
2.4.1.	Teste de permanência no frio.....	37
Capítulo III	39
3.	Resultados e Discussão	39
3.1.	Análise sumária dos vinhos.....	39
3.2.	Estabilidade Proteica.....	42
3.2.1.	Sistema Bentocheck.....	42
3.2.2.	Banho-maria	45
3.3.	Estabilidade Tartárica.....	50
3.3.1.	Teste de permanência no frio.....	50
3.3.2.	Teste mini-contacto	52
3.4.	Estabilidade Corante	57
3.4.1.	Teste de permanência no frio.....	57
Capítulo IV	59
4.	Conclusões	59
Referências bibliográficas	61
Anexos.....	67
Anexo I	68
Anexo II	69
Anexo III	70
Anexo IV	71

Índice de Figuras

Figura 1.1: Edifício da Casa Relvas (http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=132991)	1
Figura 1.2: Uva a ser descarregada no tegão (A); Desengace (B).....	5
Figura 1.3: Remontagem.....	6
Figura 1.4: Retirada das massas vínicas após transfega do mosto.....	7
Figura 1.5: Prensagem das massas vínicas.....	7
Figura 1.6: Vinho proteicamente instável (à esquerda) e estável (à direita).....	10
Figura 1.7: Vinho tartaricamente instável (A) e estável (B).....	17
Figura 1.8: Vinho instável (A) e estável (B).....	28
Figura 3.1: Efeito de diferentes doses de Pluxbenton N na variação de turbidez no vinho branco.	43
Figura 3.2: Efeito de diferentes doses de Pluxbenton N na variação de turbidez no vinho rosado.	44
Figura 3.3: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C sem tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.	46
Figura 3.4: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C com tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.	46
Figura 3.5: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C sem tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.	47
Figura 3.6: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C com tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.	48
Figura 3.7: Variação de condutividade em função da dose de Cellogum L testada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.....	53
Figura 3.8: Variação de condutividade em função da dose de Cellogum L testada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.....	54
Figura 3.9: Variação de condutividade em função da dose de Citrogum testada no vinho tinto e respectivos desvios-padrão.....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Principais componentes químicos do vinho (Valsechi, 2008).....	3
Tabela 1.2: Solubilidade em água a 20 °C em g/L do Ácido L-tartárico e os seus principais sais presentes no vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006)....	18
Tabela 3.1: Valores determinados nos parâmetros físico-químicos analisados em relação a cada vinho.....	39
Tabela 3.2: Variação de turbidez, com e sem tanino, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho branco e respectiva avaliação.....	42
Tabela 3.3: Variação de turbidez, com e sem tanino, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho rosado e respectiva avaliação.....	43
Tabela 3.4: Variação de turbidez ao longo do tempo, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho branco.....	45
Tabela 3.5: Variação de turbidez ao longo do tempo, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho rosado.....	47
Tabela 3.6: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Cellogum L testada no vinho branco.....	50
Tabela 3.7: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Cellogum L testada no vinho rosado.....	51
Tabela 3.8: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Citrogum testada no vinho tinto.....	51
Tabela 3.9: Variação de condutividade para cada dose de Cellogum L testada no vinho branco e respectiva avaliação	53
Tabela 3.10: Variação de condutividade para cada dose de Cellogum L testada no vinho rosado e respectiva avaliação.	54
Tabela 3.11: Variação de condutividade para cada dose de Citrogum testada no vinho tinto e respectiva avaliação.	55
Tabela 3.12: Avaliação qualitativa para cada dose de Maxigum testada no vinho tinto	57

Tabela A.1: Relatório das estabilidades proteica e tartárica do vinho branco e rosado, obtido pelo laboratório externo.....	68
Tabela A.2: Relatório da estabilidade tartárica do vinho tinto, obtido pelo laboratório externo.....	69
Tabela A.3: Relatório da estabilidade corante do vinho tinto, obtido pelo laboratório externo....	70
Tabela A.4: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck sem adição de tanino no vinho branco.....	71
Tabela A.5: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck com adição de tanino no vinho branco.....	72
Tabela A.6: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho branco nas doses de 0 e 40 g/hL.....	73
Tabela A.7: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho branco nas doses de 60 e 80 g/hL.....	73
Tabela A.8: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho branco nas doses de 0 e 40 g/hL.....	74
Tabela A.9: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho branco nas doses de 60 e 80 g/hL.....	74
Tabela A.10: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck sem adição de tanino no vinho rosado.....	75
Tabela A.11: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck com adição de tanino no vinho rosado.....	76
Tabela A.12: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho rosado nas doses de 0 e 40 g/hL.....	77
Tabela A.13: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho rosado nas doses de 60 e 80 g/hL.....	77
Tabela A.14: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho rosado nas doses de 0 e 40 g/hL.....	78
Tabela A.15: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho rosado nas doses de 60 e 80 g/hL.....	78
Tabela A.16: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho branco nas doses de Cellogum L testadas.....	79

Tabela A.17: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho rosado nas doses de Cellogum L testadas.....79

Tabela A.18: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho tinto nas doses de Citrogum testadas.....80

Lista de Abreviaturas e Siglas

CMC – Carboximetilcelulose

DP – Graus de Polimerização

DS - Graus de Substituição

MMT – Montmorilonita

MTA – Ácido Metatartárico

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PR proteins – *Pathogenesis-Related proteins*

TCA – Ácido Tricloroacético

TCa - Tartarato de cálcio

TH₂ - Ácido tartárico

THK - Bitartarato de potássio

TPLs – Taumatinas

UV – Ultravioleta

Capítulo I

1.1. A empresa “Casa Relvas”

A Casa Agrícola Alexandre Relvas, recentemente denominada Casa Relvas, é uma empresa familiar iniciada por Alexandre Relvas em 1997 no concelho de Évora e que conta já com a dedicação de duas gerações (Wines of Portugal, s.d).

A empresa tem atualmente algumas das vinhas em duas herdades: a Herdade de São Miguel e a Herdade da Pimenta.

A Herdade de São Miguel, adquirida em 1997 por Alexandre Relvas, está localizada no concelho de Redondo e possui no total 175 ha, dos quais 35 ha são de vinha plantada em solos franco-argilosos derivados de xisto. A restante área desta herdade é composta pelos sobreiros (*Quercus suber*), uma das árvores típicas do Alentejo, bem como é utilizada na criação e preservação de espécies autóctones portuguesas em vias de extinção, tais como o “burro de Mirandela” e o “garrano do Gerês” (Casa Relvas, s.d a).

A Herdade de Pimenta, localizada em São Miguel, concelho de Évora, foi adquirida em 2011 e possui 170 ha de área total, sendo que 65 ha encontram-se ocupados por vinha cujos solos são maioritariamente argilo-arenosos de origem granítica com afloramentos de granito. Na restante área, a Casa Relvas dedica-se à criação de ovelhas Merino Branco e Cavalos de Desporto (Casa Relvas, s.d b).

Revestida de cortiça, a adega da Herdade da Pimenta (Figura 1.), construída em 2009 foi projetada para produção de vinho em larga escala estando preparada para transformar anualmente cerca de 2,5 milhões de quilos de uva (Casa Relvas, s.d c).



Figura 1.1: Edifício da Casa Relvas
(<http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=132991>)

Atualmente a empresa gere cerca de 350 hectares de vinha e produz 6 milhões de garrafas por ano, 70% das quais são exportadas para mais de 30 países como a Bélgica, Japão e Brasil. Os vinhos produzidos pela Casa Relvas são concebidos a partir de uva maturada e colhida na região alentejana, proveniente de castas tradicionais do Alentejo, e por isso a sua gama de

vinhos integra a categoria de Vinho Regional Alentejano. São exemplo algumas das castas utilizadas na produção de uva, as castas brancas Antão Vaz e Arinto e castas tintas como Touringa Nacional, Syrah, Trincadeira, Aragonez, Alfrocheiro, entre outras (Casa Relvas, s.d d).

Hoje em dia, na Casa Relvas são produzidos os mais diferentes tipos de vinho, o vinho branco, vinho rosado, vinho tinto e ainda o vinho branco num tom laranja que se caracteriza pelo facto de à semelhança do vinho tinto, o desengace ser parcial, realizando-se a maceração e fermentação alcoólica junto com as películas o que dá esta cloração alaranjada (Casa Relvas, s.d e).

Alargando os seus horizontes, a Casa Relvas converteu ainda cerca de 10 ha das vinhas da Herdade de São Miguel para o modo de Produção Biológico, produzindo assim vinho biológico proveniente das suas castas bem como se dedica ainda à produção de vinho de talha.

A Casa Relvas dá assim a conhecer uma vasta gama de vinhos de elevada qualidade tais como: Herdade de São Miguel, Herdade da Pimenta, Ciconia, Montinho São Miguel, Art.Terra, Monte dos Amigos, São Miguel dos Descobridores, Atlântico, Aya, São Miguel das Missões, Segredos de São Miguel e Special Edition, vinhos estes que ao longo dos anos têm vindo conquistar inúmeras medalhas de ouro em concursos internacionais e têm recebido as mais elevadas pontuações da imprensa especializada como a Decanter, Wine Spectator, Wine Enthusiast e Wine and Spirits (Wines of Portugal, s.d).

É de salientar ainda que devido ao aumento da procura turística neste sector e de forma a dar a conhecer aos consumidores toda esta arte que é a produção de vinho, a Casa Relvas tem recentemente desenvolvido um programa de Enoturismo que permite que o consumidor fique a par de todo o processo de produção do vinho, desde a vinha, processo de vinificação, passando pelo laboratório até ao engarrafamento e expedição do produto.

1.2.O vinho: constituição e processo produtivo

Segundo a Organização internacional da vinha e do vinho (OIV), o vinho é a bebida resultante exclusivamente da fermentação alcoólica completa de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mosto de uvas sendo que o seu teor alcoólico real não deve ser inferior a 8,5% vol. (OIV Code Sheet – Issue 2015/01)

Estudos recentes têm demonstrado que o consumo moderado de vinho tinto pode ser benéfico para a saúde, ajudando a reduzir o risco de doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, alguns tipos de cancro, distúrbios metabólicos, e também pode estimular uma resposta imune contra inflamações. Estes efeitos devem-se ao facto de, contrariamente a outras bebidas alcoólicas, o vinho conter polifenóis, como antocianinas, flavonóis e resveratrol, provenientes principalmente de sementes de uvas vermelhas e peles que têm um impacto positivo na saúde, graças ao seu efeito antioxidante (Vecchio et al., 2017).

Para além destes componentes, o vinho contém ainda vários componentes químicos diferentes que influenciam as propriedades sensoriais do produto final em diferentes graus. A quantidade e a composição de muitos desses componentes podem ser conscientemente modificadas ao longo do processo de vinificação, através da escolha do método de produção (Jones et al., 2008).

A sua composição química inclui diversos componentes representados na Tabela 1.1:

Tabela 1.1: Principais componentes químicos do vinho (Valsechi, 2008)

Componente	Sub-Componente
Água (85-90 %)	
Alcóois (7-24 %)	Etanol (72-120 g/L) Glicerol (5-10 g/L) Outros: Metanol, Isopropil, etc
Ácidos (1-8 % - Total de 5-7 g/L)	<u>Provenientes da uva</u> Tartárico (50-90 %) Málico (10-40 %) Cítrico (0-5 %) <u>Provenientes da fermentação</u> Succínico Lático Acético Butírico Fórmico Propiónico Carbónico (\pm 0,5 g/L nos espumantes)

Tabela 1.1: Principais componentes químicos do vinho (Valsechi, 2008) (continuação).

Componente	Sub-Componente
Açúcares (0-15 %)	Glucose (7-15 % na uva) Frutose (7-15 % na uva) Outros: Xilose e Arabinose
Substâncias fenólicas (Branços: <350 mg/L Tintos: < 3000 mg/L)	Taninos Antocianinas Flavonas Outros: fenóis ácidos, etc
Outras substâncias	<u>Aldeídos:</u> Acetaldeído <u>Ésteres:</u> provenientes dos ácidos acético, tartárico e málico <u>Vitaminas:</u> A, C, B1, B2, B6, Biotina, Niacina, Inositol e Ácido pantoténico <u>Aminoácidos:</u> Alanina, Arginina, Glicina, Histidina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Metionina, Lisina, Serina, Treonina, Tirosina, Valina, Fenilalanina e Aspartato <u>Sais minerais:</u> Sódio, Potássio, Cloro, Cálcio, Magnésio, Ferro, Manganês, Cobre, Zinco, Crómio, Silício, Iodo, Boro, Molibdénio, Tálho e Vanádio <u>Conservantes:</u> SO ₂ ou anidrido sulfuroso ou metassulfito e Sorbato de potássio

A produção do vinho é um processo que envolve várias etapas em que cada uma deve ser executada de forma rigorosa para que no final se obtenha um vinho com elevada qualidade:

Colheita: De forma a determinar quando a uva já se encontra apta para a colheita são realizadas análises periódicas para determinar o grau de maturação dos frutos com o objectivo de acompanhar a sua evolução.

A colheita deve ocorrer no momento certo, ou seja, quando a maturação da fruta atinge os parâmetros de açúcares e ácidos necessários para obter determinado vinho. O momento da colheita deve ser uma tarefa programada, organizada e rápida. As uvas devem ser transportadas rapidamente até à adega, correctamente acondicionadas para evitar o seu esmagamento (Lona, 2003).

Recepção: Na chegada das uvas à adega, estas devem ser processadas imediatamente, evitando que fiquem expostas ao sol nos camiões (Lona, 2003).

Nesta fase, o procedimento adoptado na empresa refere que em primeiro lugar, a uva recepcionada é pesada e avaliado o seu estado sanitário, depois é retirada uma amostra aleatória de uva e encaminhada para o laboratório, onde são analisados alguns parâmetros como o pH, temperatura, acidez e álcool provável.

Desengace / Esmagamento: Após a uva ser descarregada do tegão (Figura 1.2), é feito o desengace que envolve a remoção das folhas e outros materiais que possam surgir, dos bagos de uvas (Jackson, 2008).

Esta separação é importante, uma vez que a parte lenhosa confere sabor amargo e adstringência nos vinhos. O esmagamento consiste em esmagar as uvas de forma a romper a película da uva para que se liberte o seu sumo, dando início à maceração (Jackson, 2008).

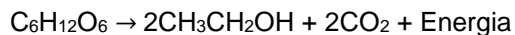


Figura 1.2: Uva a ser descarregada no tegão (A); Desengace (B).

Maceração: A maceração é uma das etapas mais importantes do processo de vinificação, pois o mosto permanece em contato com as matérias-primas (sementes de uvas, peles e polpa) levando à extração de nutrientes, aromatizantes e outros constituintes, como compostos fenólicos, polissacáridos, azoto, minerais e compostos voláteis. É nesta etapa que os vinhos alcançam a estrutura aromática, bom gosto e cor (Rivero et al., 2019).

A maceração pode também contribuir para a estabilidade da cor, se este processo não for prolongado (Gómez-Plaza et al., 2002).

Fermentação Alcoólica: A fermentação alcoólica é a conversão de açúcares, principalmente glucose e frutose, em etanol e dióxido de carbono (Grainger & Tattersall, 2008). Esta conversão pode ser representada por:



Como este processo pode ser realizado sem a presença de oxigénio é considerado um processo anaeróbico. A fermentação alcoólica é um processo realizado pela levedura do género *Saccharomyces* e deve ser realizada a uma temperatura entre 25-30 °C (Polo, 2009; Valsechi, 2008)

Remontagem: Com o aumento de CO₂, os sólidos e as peles têm tendência a subir à superfície criando uma capa flutuante, o que é uma desvantagem, visto que as peles precisam de estar em contato com o sumo da uva para que haja uma boa extração de cor e taninos (Grainger & Tattersall, 2008).

Assim, durante este processo, o sumo é bombeado do fundo da cuba para a parte superior (Figura 1.3), de forma a submergir esta capa. Este processo, conhecido como remontagem, tem o benefício adicional de oxigenar o mosto, o que ajuda na multiplicação das leveduras (Grainger & Tattersall, 2008).



Figura 1.3: Remontagem.

Transfega: neste processo o mosto é transferido de uma cuba para outra, com o objectivo de separar a fase líquida da fase sólida. As peles e outros sólidos (massa vínica) são deixados para trás na cuba de fermentação (Figura 1.4) para serem encaminhados para a prensa. Nesta fase, se necessário, pode ainda ser adicionado dióxido de enxofre (Grainger & Tattersall, 2008).

O dióxido de enxofre é o conservante mais utilizado em enologia, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo essencial para o controlo de fermentações indesejáveis e deterioração oxidativa nos vinhos, inibindo a ação de leveduras e bactérias (Castro-Marín et al., 2018).

Ao longo do processo de vinificação podem ser realizadas mais transfegas para remover as borras e sedimentos do vinho e para clarificá-lo (Grainger & Tattersall, 2008).

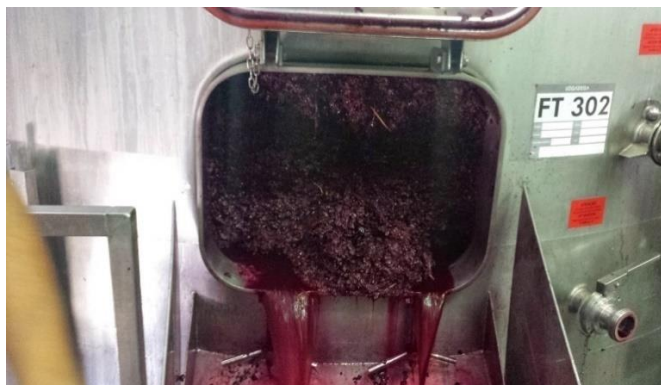


Figura 1.4: Retirada das massas vínicas após transfega do mosto.

Prensagem: A massa vínica obtida é prensada através de uma prensa (Figura 1.5), de forma a libertar o mosto que ainda se encontra nas massas vínicas (pele e grainha). O mosto obtido na prensagem (10 e 15 % do mosto total) terá um maior teor em taninos e pigmentos corantes. Alguns produtores optam por fazer o seu vinho apenas a partir do mosto trasfegado, visto que o mosto obtido através da prensa poderá conter algum sabor adstringente e herbáceo (Grainger & Tattersall, 2008).



Figura 1.5: Prensagem das massas vínicas.

Fermentação Maloláctica: A fermentação maloláctica consiste na conversão enzimática do ácido L-málico em ácido L-láctico realizada por bactérias lácticas principalmente por *Oenococcus oeni*, uma espécie que suporta o baixo pH (< 3.5), alto teor de etanol (> 10 % vol.) e altos níveis de SO₂ (50 mg/L) encontrados no vinho nesta fase. Contudo também podem estar envolvidas na fermentação maloláctica, estirpes mais resistentes de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* especialmente se o pH do vinho for superior a 3,5 (Polo, 2009).

Os principais efeitos da fermentação maloláctica são o aumento do pH e a redução da acidez percebida, proporcionando um sabor mais suave (Jackson, 2008). No entanto também contribui para a complexidade do sabor e aroma do vinho e melhora a estabilidade microbiana (Polo, 2009).

Embora a maioria dos vinhos tintos se beneficie da fermentação maloláctica, o mesmo não acontece com os vinhos brancos. O aroma mais suave da maioria dos vinhos brancos torna-os mais suscetíveis a mudanças de sabor potencialmente indesejáveis induzidas pela fermentação maloláctica. A retenção de acidez também contribui para o seu sabor fresco o que leva a que não seja realizada a fermentação maloláctica nos vinhos brancos (Jackson, 2008). Neste caso e como alternativa para evitar esta fermentação o vinho pode ser tratado com dióxido de enxofre e/ou mantido a baixas temperaturas (Grainger & Tattersall, 2008).

A fermentação maloláctica não controlada também apresenta um risco de deterioração do vinho devido a compostos que podem produzir sabores desagradáveis (ácido acético, fenóis voláteis) ou que podem ser perigosos para a saúde humana (carbamato de etilo e aminas biogénicas) (Polo, 2009).

Estágio / Maturação: Imediatamente após a fermentação, os vinhos podem ter ainda um gosto ácido e bastante desagradável sendo por isso necessário um período de maturação durante o qual os taninos suavizam e os níveis de acidez diminuem (Grainger & Tattersall, 2008).

A maturação do vinho pode ser realizada em cubas de inox ou barris de madeira e a escolha do local de maturação e o período de tempo em que o vinho estará a “estagiar” dependem do estilo do vinho a ser produzido, dos fatores de qualidade e do custo (Grainger & Tattersall, 2008).

Assim, o vinho é, portanto, armazenado até ser necessário para o engarrafamento (Grainger & Tattersall, 2008).

1.3. Estabilidade Proteica

As proteínas são uma das principais macromoléculas do vinho, juntamente com polissacáridos e polifenóis, estima-se que o vinho branco contém entre 10 a 500 mg/L de proteína cuja massa molecular varia entre 9 a 66 kDa e pontos isoelétricos de 3 a 9 (Marangon et al., 2014).

Estas proteínas podem surgir de diversas fontes, através da adição no vinho de agentes à base de proteínas, como a caseína, a cola de peixe e a ovalbumina, que são utilizados para melhorar o aroma do vinho e a sensação na boca, bem como através das leveduras que libertam manoproteínas durante a fermentação como resultado da lise celular (Jaeckels et al., 2017). Estas últimas são moléculas glicosiladas com um teor de proteína de 1-9 % e que são discutidas como benéficas para o vinho, por exemplo, no que diz respeito à textura e estabilidade (Caridi, 2006). Embora sejam detectadas proteínas de leveduras como de *Saccharomyces cerevisiae* e fungos filamentosos como *Botrytis cinérea* nos vinhos, estudos comprovaram que a maioria das proteínas do vinho provêm da polpa de uva (Batista et al., 2009).

A diversidade de proteínas que podemos encontrar nos mostos e vinhos é muito menor do que nas uvas, uma vez que apenas proteínas solúveis são extraídas durante o processo de vinificação, diminuição essa que se deve à atividade proteolítica, à precipitação por polifenóis e a condições desfavoráveis relacionadas aos baixos pHs e ao aumento dos teores em etanol. Outros fatores podem também afetar o conteúdo final de proteína como a variedade da uva, a maturidade e o processo de vinificação (Sauvage et al., 2010).

Por conseguinte, as proteínas têm assim uma grande influência na qualidade do vinho, pois apresentam uma variedade de propriedades. Estão envolvidas, por exemplo, na turbidez do vinho branco, nas características organolépticas através da sua interação com compostos aromáticos juntamente com as interações com as quais elas podem estar envolvidas com outros compostos de vinho, como etanol, polifenóis e polissacárideos, na proteção do vinho contra a precipitação do sal tartárico e na formação de espuma nos vinhos espumantes (Mainente et al., 2014).

Elas estão de facto envolvidas em vários aspectos, alguns deles que podem prejudicar a aceitação do vinho pelos consumidores, como é o caso da formação de turvação nos vinhos brancos e rosados durante o armazenamento na garrafa. Este fenómeno é normalmente observado após o engarrafamento quando o vinho é exposto a condições desfavoráveis como temperaturas elevadas durante o armazenamento ou transporte que levam à desnaturação lenta das proteínas do vinho originando a agregação de proteínas e floculação numa suspensão turva (Figura 1.6), levando ao aparecimento de uma névoa ou depósito no vinho engarrafado (Waters et al., 2005).

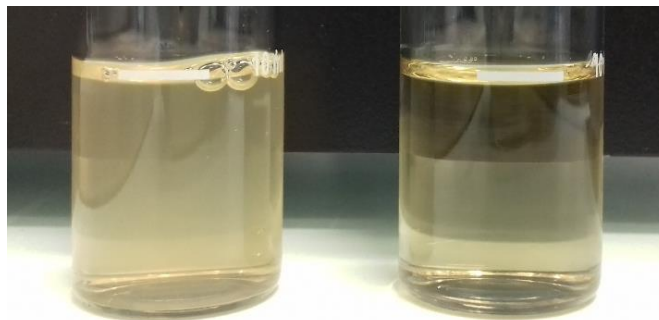


Figura 1.6: Vinho proteicamente instável (à esquerda) e estável (à direita)

Esta névoa pouco atraente não afeta as características olfativas e gustativas do vinho, no entanto, a translucidez é de grande importância para a qualidade do vinho, porque essa propriedade dá a primeira impressão ao consumidor, que por norma rejeita os vinhos que contêm precipitados nebulosos, independentemente do gosto do vinho (Batista et al., 2009).

Os mecanismos associados à formação de turvação nos vinhos não são bem compreendidos e ainda são frequentemente citados como um processo de duas fases (Van Sluyter et al., 2015). Imediatamente após vinificação e clarificação, as proteínas do vinho são estáveis, dobradas no seu estado nativo e o vinho é translúcido (Marangon et al., 2014).

Numa primeira fase, as proteínas do vinho desdobram-se em resposta a estímulos como elevadas temperaturas de armazenamento, resultando na exposição de cadeias laterais de aminoácidos que normalmente estão escondidas no núcleo da proteína. As cadeias laterais recém-expostas são então livres para se associarem com proteínas vizinhas ou com outros componentes do vinho para formar agregados (Marangon et al., 2014). O mecanismo de desdobramento de proteínas é amplamente influenciado pela temperatura, visto que temperaturas mais altas levam a um desdobramento mais rápido da proteína (Van Sluyter et al., 2015).

Numa segunda fase, as proteínas instáveis começam-se a auto-agregar por meio de interações hidrofóbicas (Van Sluyter et al., 2015).

Recentemente, Van Sluyter e colaboradores referem ainda a existência de uma terceira fase que consiste na ligação cruzada de diferentes agregados de proteína em que os agregados se tornam gradualmente reticulados devido à acção dos sulfitos e polifenóis causando assim uma união entre os agregados de proteínas (Van Sluyter et al., 2015).

Segundo Waters et al. (1996), as proteínas responsáveis por esta turvação nos vinhos foram identificadas como sendo proteínas relacionadas com a patogenicidade da uva (PR) como proteínas semelhantes a taumatinas (TLPs) e quitinasas que se encontram na faixa de 20 a 30 kDa com pontos isoelétricos (p_i) entre 3 e 5 e são proteínas ácidas (Mesquita et al., 2001). Estas proteínas normalmente surgem no vinho branco juntamente com outras proteínas PR de

ocorrência menor, como por exemplo, invertases, β -1,3-glucanases e proteínas de transferência de lipídios (Marangon et al., 2012).

Esta classe de proteínas, relacionadas com a patogenicidade, são sintetizadas na uva durante o amadurecimento e constituem um mecanismo de defesa das plantas contra o ataque fúngico sendo expressos em plantas saudáveis e expressos em resposta a stresses bióticos ou abióticos (Marangon et al., 2014). Elas são capazes de persistir durante todo o processo de vinificação, principalmente devido à sua resistência à proteólise e à sua estabilidade em pH ácido (Lambri et al., 2012). Nesse sentido, a quantidade de polipeptídeos que se acumulam nas uvas maduras e vinhos é determinado pelas condições ambientais e patológicas que prevalecem durante o crescimento vegetativo (Ferreira et al., 2004).

A presença de proteína no vinho é claramente um pré-requisito para a formação de turvação e parece geralmente aceitar que quanto maior o teor de proteína total no vinho, maior a sua tendência para se tornar instável (Mesquita et al., 2001).

No entanto, outros estudos mostraram que a instabilidade proteica não se correlaciona bem com o teor de proteína total do vinho e, portanto, o potencial do vinho em desenvolver a turvação não é previsível a partir da sua concentração de proteína. Investigações revelam que cada tipo de proteína se comporta de uma forma diferente em relação à sensibilidade ao calor devido às propriedades moleculares das mesmas, o que influencia a sua tendência natural para precipitar, mostrando desta forma que apenas uma parte das proteínas são responsáveis pela instabilidade (Batista et al., 2009).

Como já foi referido as proteínas semelhantes a taumatinas (TLPs) e quitinases podem sofrer alterações na sua integridade estrutural sob certas condições, contudo nas mesmas condições ambas reagem de formas diferentes. Em termos de comparação, nas mesmas condições, as quitinases são mais instáveis ao calor e mais propensas a agregar do que as TLPs (Falconer et al., 2010), visto que se desdobram a uma temperatura mais baixa que as TLPs, a 55 e 62 °C, respectivamente (Van Sluyter et al., 2015). Além disso, as quitinases uma vez desdobradas pelo calor não recuperaram a sua estrutura original após arrefecimento, ao contrário de algumas isoformas de TLPs (Marangon et al., 2014). Este desdobramento irreversível (desnaturação) mostrou conduzir à agregação de proteínas e subsequente precipitação de quitinases e das isoformas de TLPs que desnaturam (Van Sluyter et al., 2015). Alguns estudos também relatam a alta sensibilidade ao calor das β -glucanases, no entanto esta última classe de proteína nem sempre é encontrada em vinhos brancos (Pocock & Rankine, 1973)

Todavia, a formação de turvação nos vinhos tem sido descrita como um processo multifatorial pelo qual alguns fatores contribuintes têm sido propostos além das proteínas, como factores não proteicos, por exemplo outros ingredientes do vinho, minerais, oligoelementos, polifenóis, polissacáridos e sulfitos, bem como diferentes condições ambientais, nomeadamente pH, teor alcoólico, temperatura e força iónica (Batista et al., 2009).

Mais recentemente, Chagas e colaboradores, identificaram o dióxido de enxofre adicionado durante o processo de vinificação como um modulador no aparecimento de turvação visto que a

adição de dióxido de enxofre em concentrações crescentes à proteína de vinho isolada, em solução modelo de vinho, desencadeou agregação proteica proporcional e turvação da solução por aquecimento (Chagas et al., 2016). Em contrapartida, acredita-se que polissacarídeos de alto peso molecular, como as manoproteínas, têm função protetora na formação de turvação (Jaeckels et al., 2016).

1.3.1. Métodos de avaliação da estabilidade proteica

Teste térmico

Os testes por desnaturação térmica são os mais utilizados na indústria. Neste teste a amostra é aquecida a uma dada temperatura durante um período de tempo específico, induzindo a desnaturação das proteínas através do calor provocando assim a precipitação. Após equilíbrio à temperatura ambiente, cerca de 20 °C, é medida a turvação calculando a diferença entre amostras aquecidas e não aquecidas em unidades de turbidez nefelométrica (NTU) por meio de um nefelômetro. O vinho é considerado estável se a diferença de turvação for inferior a 2 NTU (Marangon et al., 2012).

O processo de arrefecimento é muito importante visto que, apesar de as proteínas se desdobrarem à medida que o vinho é aquecido, o vinho apresenta turvação somente após o arrefecimento (Van Sluyter et al., 2015).

O método mais amplamente utilizado é o proposto em 1973 por Pocock & Rankine, que consiste num tratamento térmico a 80 °C durante 6 h. Contudo, alguns autores executam este método durante apenas 2 h, visto que consideram que não é necessário sujeitar o vinho a um tempo tão prolongado de exposição ao calor, sugerindo que desta forma se obtêm resultados aceitáveis, e que a exposição durante 6 h leva a que não só provoque a precipitação de proteínas, como também de outras macromoléculas do vinho, não sendo necessário, pois na realidade o vinho muito dificilmente será exposto a condições tão drásticas. Porém, o teste térmico parece, portanto, ser um indicador adequado do teor total de proteínas suscetíveis à precipitação para determinar a quantidade de agente colante requerido para remover as proteínas ditas instáveis do vinho. Uma preocupação com este tipo de testes é a aceleração da oxidação e condensação de compostos fenólicos com as proteínas, a altas temperaturas, que causam precipitação e podem, portanto, interferir nos resultados do teste (Sarmiento et al., 2000a).

Teste do Ácido Tricloroacético

O teste do ácido tricloroacético (TCA) é baseado na destruição química das estruturas das proteínas a um pH abaixo de 1, e é, portanto, um método agressivo para quantificar a proteína total (Boulton, 1980).

Neste teste, é adicionado TCA à amostra de vinho e posteriormente a amostra é submetida à ebulição durante 5 min, seguida de um período de arrefecimento e medição da formação de turvação (Sarmiento et al., 2000a).

Bentoteste

O bentoteste foi desenvolvido por Jakob em 1962, e usa uma solução de ácido fosfomolibdico preparado em ácido clorídrico para desnaturar e precipitar as proteínas do vinho. Ele precipita a proteína no vinho neutralizando a carga sobre as moléculas de proteína e agrega-as por reticulação com o ião de molibdénio. Este método é de fácil e rápida execução em que apenas é necessária a adição de 4 mL de solução comercial de Bentotest a 40 mL de vinho e de seguida é medida a diferença de turbidez antes e depois da adição de reagente Bentotest (Esteruelas et al., 2009). A precipitação é proporcional à quantidade de proteína presente (Zoecklein, 1991).

Uma desvantagem deste método é que tende a ser mais sensível do que o teste térmico, podendo assim dar origem a falsos positivos (Pocock & Rankine, 1973).

Teste do Etanol

O teste de precipitação com etanol baseia-se na diminuição da constante dielétrica, o que irá diminuir a solubilidade da proteína, causando assim a precipitação das frações de proteína menos solúveis no pH do vinho (Lehninger, 1973).

Neste método, 5 mL etanol puro são adicionados a um volume igual de amostra de vinho e mantidos em frascos fechados à temperatura ambiente durante 2h. Seguidamente é medida a turbidez induzida à temperatura ambiente (Sarmiento et al., 2000a).

Alguns factores influenciam significativamente o desenvolvimento da turbidez neste método, tais como a proteína total, o cálcio e o pH. Resultados do estudo de Sarmiento e colaboradores mostraram que a determinação da dosagem do agente colante necessária para a remoção da proteína do vinho com base no teste do etanol é feita em excesso, porque a quantificação também considera a influência da precipitação induzida pelo cálcio (Sarmiento et al., 2000a).

Teste de precipitação de taninos

O teste de precipitação de taninos baseia-se no pressuposto de que as proteínas precipitam no vinho durante o armazenamento ligando-se a compostos fenólicos de elevado peso molecular, como os taninos (Sarmiento et al., 2000a).

Neste método, descrito por Mesrob et al. (1983), são misturados 5 mL de vinho com 0,4 mL de solução de tanino 1 % e deixa-se 15 min à temperatura ambiente, de seguida é levado à

ebulição durante 3 min. Após arrefecer é lida a turbidez contra um branco constituído apenas por uma amostra de vinho não tratado (Mesrob et al., 1983).

Este teste é influenciado por muitos fatores: pH, teor de proteína total, de ferro, de potássio e ainda do teor em cobre. O teste do tanino é, portanto, afetado por muitos fatores intrínsecos do vinho e como tal não é recomendado para determinar a quantidade de agente colante necessária para a estabilização do vinho (Sarmiento et al., 2000a).

1.3.2. Métodos de estabilização proteica

Adsorventes

Atualmente, a maneira mais eficaz de prevenir o aparecimento de turvação nos vinhos brancos e rosados é o tratamento com bentonite (Mierczynska-Vasilev et al., 2017).

Este tratamento que tem por base a troca catiónica, tem sido o mais amplamente utilizado na enologia desde a década de 1930 (Saywell, 1934).

A bentonite é uma argila carregada negativamente no pH do vinho, que interage electrostaticamente com as proteínas carregadas positivamente, ligando-se a elas e induzindo a sua floculação, arrastando estas para o fundo dos depósitos (Lambri et al., 2012). Este agente clarificante é composto principalmente por cerca de 75% de montmorilonita. A montmorilonita (MMT) possui uma estrutura multicamada de plaquetas formadoras de hidrosilicato de alumínio (Mierczynska-Vasilev et al., 2017).

Porém, o uso de bentonite é dispendioso e apresenta várias desvantagens do ponto de vista da qualidade (Marangon et al., 2014).

Embora a bentonite seja eficaz na remoção de proteínas responsáveis pela formação de turvação nos vinhos brancos e rosados, como absorve de forma não específica moléculas carregadas positivamente, o seu uso pode afetar adversamente a qualidade do vinho tratado, pois irá absorver não apenas os componentes relacionados com o aparecimento de turvação, como também levará à remoção de compostos aromáticos e polifenóis, que são benéficos para as propriedades sensoriais como a cor, sabor e aroma, levando a perdas de qualidade (González-Neves et al., 2014; Jaeckels et al., 2017).

Outra desvantagem, é que como a bentonite incha quando aplicada no vinho e por ter características de sedimentação pobres, 3 a 10 % do volume do vinho é perdido nas borras de bentonite (Mierczynska-Vasilev et al., 2017). O uso de bentonite também tem vindo a ser uma preocupação do ponto de vista ambiental visto que a eliminação da bentonite utilizada constitui uma fonte não negligenciável de resíduos bem como o seu manuseio também é uma preocupação em questões de segurança e de saúde ocupacional associados à inalação do pó da bentonite (Sauvage et al., 2010).

Apesar de existirem várias estratégias para combater a formação de proteínas do vinho, a remoção de proteínas instáveis através da utilização de bentonite continua a ser a operação mais

eficiente de estabilização de proteínas nos vinhos. Diversas alternativas de adsorventes têm sido propostas, mas nenhuma provou ser suficientemente eficaz para substituir a bentonite (Marangon et al., 2012).

Segundo o estudo de Sarmiento e colaboradores que, testou a possibilidade de utilização de outros adsorventes como a bentonite sódica tratada termicamente, argilas adsorventes de baixa expansão, resinas de troca iônica e outros adsorventes de proteínas como sílica gel, hidroxiapatita e alumina, cujos resultados mostraram que algumas resinas de troca iônica como argilas adsorventes de baixa expansão e sílica gel, têm um bom potencial para adsorver proteínas (Sarmiento et al., 2000b).

O estudo desenvolvido por Cabello-Pasini et al. (2005), indicou que a utilização de polissacarídeos como carragenina e ácido algínico extraídos de algas marinhas podem ter uma maior capacidade de estabilização do vinho sem modificar a composição de taninos dos vinhos.

Segundo De Bruijn et al. (2009) a utilização do trocador de catiões SP-Trisacryl-M permite remover 76% das proteínas do vinho enquanto a bentonite consegue remover 95 % das proteínas do vinho.

O dióxido de zircônio (ZrO_2) também foi uma opção, investigada por Pashova et al. (2004), por ser um material adsorvente de proteínas que pode ser regenerado e, portanto, reutilizado. O ZrO_2 apresentou potencial para remover proteínas formadoras de turvação durante e após a fermentação. Entretanto, apesar de ZrO_2 mostrar-se promissor e a capacidade de ser regenerado com um simples procedimento de lavagem, estudos efectuados por Salazar et al. (2006) demonstraram uma redução na quantidade de polifenóis removidos do vinho em relação ao uso de bentonite, no entanto a percentagem de remoção de proteína continua a ser baixa quando comparada com a utilização de bentonite.

Outro potencial polissacarídeo adsorvente de proteína é a quitina, um componente que se pode encontrar no exoesqueleto de crustáceos. A sua estrutura torna-a seletiva para a ligação a quitinases (Van Sluyter et al., 2015). O efeito da quitina [poli-(N-acetil-1,4- β -D-glucopiranosamina)], um polímero natural abundante e de baixo custo, foi avaliado por Vincenzi et al. (2005) que observou que este polímero podia remover proteínas do vinho envolvidas na formação de turvação mais especificamente que a bentonite. No entanto, os efeitos tanto na qualidade organolética como na estabilidade a longo prazo dos vinhos tratados com quitina teriam ainda de ser determinados nas condições reais de vinificação (Vincenzi et al. 2005).

Pasteurização “Flash”

Como as proteínas PR são instáveis ao calor, vários autores investigaram os efeitos da pasteurização instantânea para a sua remoção (Marangon et al., 2012).

Investigações demonstraram que os vinhos sujeitos ao processo de pasteurização apresentam melhorias quanto à estabilidade proteica, mas tem um efeito prejudicial na qualidade do vinho (Ferenczy, 1966).

Pesquisas posteriores realizadas por Francis et al. (1994) constataram que o aquecimento do vinho por um curto período a 90 °C não teve efeitos sensoriais negativos.

Ultrafiltração

A ultrafiltração também pode ser eficaz na remoção de proteínas causadoras do aparecimento de turvação nos vinhos, embora o processo não seja seletivo e possa levar a grandes perdas de outros componentes importantes do vinho, incluindo polissacarídeos (Van Sluyter et al., 2015).

Segundo Ferreira et al. (2001) a ultrafiltração com membranas de 10 kDa de corte permite uma boa e eficiente eliminação das proteínas dos vinhos.

Esta aplicação tem ainda a desvantagem dos altos custos dos equipamentos necessários para este processo.

Enzimas proteolíticas

Outra possível solução seria desenvolver enzimas proteolíticas capazes de degradar estas proteínas instáveis do calor, de modo a impedir a sua agregação durante a produção de vinho (Marangon et al., 2014).

Vários autores investigaram os efeitos da utilização de enzimas proteolíticas microbianas tais como as de *Aspergillus niger* (Bakalinsky & Boulton, 1985), *Saccharomyces cerevisiae* (Feuillat et al., 1980) e *Botrytis cinerea* (Girbau, 2004). No entanto, em cada estudo, as enzimas proteolíticas não foram capazes de degradar efetivamente as proteínas PR da uva por causa de sua alta resistência à proteólise e porque as condições de temperatura do vinho são desfavoráveis à atividade enzimática (Marangon et al., 2012).

Um estudo de Pocock et al. (2003) mostrou que a combinação de enzimas proteolíticas com tratamentos térmicos de vinho a 90 °C durante 1 min, reduziu a necessidade de utilização da bentonite em 50-70 % sem afetar os perfis sensoriais (Marangon et al., 2012).

Atualmente têm sido estudadas ainda algumas alternativas, em que uma delas testada por Mierczynska-Vasilev et al. (2017) passa por desenvolver uma tecnologia de separação magnética que permita uma separação rápida e eficiente das proteínas causadoras de turvação nos vinhos.

Esta técnica envolve uma modificação na superfície das nanopartículas de aço de forma a criar locais de fixação para as proteínas do vinho que por sua vez são agarradas por uma força magnética externa. Isto pode levar ao desenvolvimento de uma nova tecnologia para a remoção magnética rápida e seletiva de proteínas indesejáveis, relacionadas com a patogênese dos vinhos (Mierczynska-Vasilev et al., 2017).

Uma grande vantagem é que com esta técnica é possível remover as proteínas sem alterar significativamente a composição fenólica dos vinhos (Mierczynska-Vasilev et al., 2017), visto que como as substâncias fenólicas presentes nas uvas também estão envolvidas na formação de turvação por interagirem com as proteínas (Tian et al., 2019), estas acabam também por serem eliminadas, ao contrário da utilização de métodos como a aplicação de bentonite.

Recentemente, Mierczynska-Vasilev et al. (2019) refere que a vantagem de usar o revestimento de plasma na superfície das nanopartículas, passa por permitir adaptar precisamente a química da superfície das partículas com funcionalidades conhecidas e desejadas.

Neste estudo, foram examinadas uma série de revestimentos de superfície que possuem cargas positivas ou negativas fornecendo assim diferentes mecanismos de interação com as proteínas, influenciando desta forma a eficiência de remoção de proteínas formadoras de turvação do vinho (Mierczynska-Vasilev et al., 2019). No estudo foram testados monómeros de alilamina, ácido acrílico e 2-metil-2-oxazolona para produzir revestimentos de plasma ricos em grupos funcionais amina, carboxilo e oxazolona, cujos resultados demonstraram que os três revestimentos são capazes de adsorver proteínas de vinho, apresentando o grupo carboxilo maior eficiência, seguido do grupo oxazolona e por último o grupo amina (Mierczynska-Vasilev et al., 2019).

1.4. Estabilidade Tartárica

A instabilidade tartárica nos vinhos é um sério problema enológico nos vinhos engarrafados, visto que esta instabilidade pode causar a formação de precipitados no fundo da garrafa (Malacarne et al., 2013).

Embora o aparecimento desses cristais (Figura 1.7) em garrafas de vinho seja um processo natural, que não afeta nem o sabor nem o odor, é considerado indesejável tanto pelos consumidores como pelos produtores (Artigas et al., 2003).

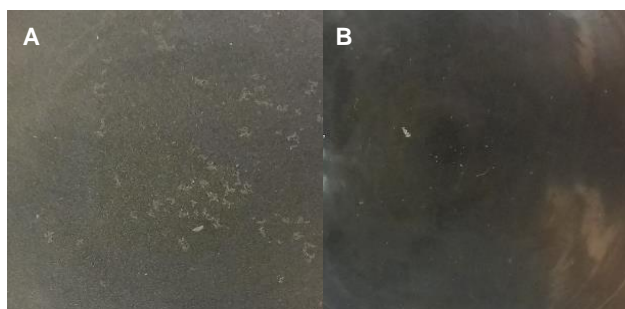


Figura 1.7: Vinho tartaricamente instável (A) e estável (B)

Uma causa frequente da perda de estabilidade de um vinho é a formação de sais cristalinos provenientes do ácido tartárico, que na presença de cátions K^+ e Ca^{2+} podem surgir na forma de bitartarato de potássio (THK), tartarato de potássio (TK_2), tartarato de cálcio (TCa) e ainda na forma de tartromalato de cálcio (Ribéreau-Gayon et al., 2006). No entanto o bitartarato de potássio e, em menor grau, o tartarato de cálcio, são a causa mais comum desta instabilidade (Lasanta & Gómez, 2012).

O hidrogenotartarato de potássio (THK), geralmente conhecido como bitartarato de potássio é um constituinte natural da uva. A fermentação alcoólica durante a produção de vinho leva a uma diminuição na solubilidade deste sal devido à presença de etanol (Gonçalves et al., 2003), pois enquanto o bitartarato de potássio é muito solúvel em água (Tabela 1.2), é relativamente insolúvel em álcool. Assim, numa solução alcoólica diluída a 10 % v/v e a 20 °C, a sua solubilidade é de apenas 2,9 g/L. Como a concentração de potássio no vinho é geralmente tão elevada como 780 mg/L, isto é, 3,76 g/L de THK, a concentração do sal é superior à sua solubilidade, o que leva a que uma parte fique solúvel e a restante precipitável (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Tabela 1.2: Solubilidade em água a 20 °C em g/L do Ácido L-tartárico e os seus principais sais presentes no vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Ácido Tartárico (H_2T)	Bitartarato de Potássio (THK)	Tartarato de Cálcio (TCa)
4,9 g/L	5,7 g/L	0,53 g/L

Assim, a formação dos cristais envolve três fases: a fase de sobressaturação, fase de nucleação e a fase de crescimento (Salgues et al., 1982).

A fase de sobressaturação, ocorre quando o produto de concentrações ultrapassa o valor do produto de solubilidade, passando a existir assim uma solução sobressaturada onde ocorre a precipitação de cristais. Contudo a sobressaturação é necessária, mas não suficiente para a ocorrência de fenómenos de nucleação e cristalização espontânea, sendo precisa também energia (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A fase de nucleação consiste na formação de um pequeno cristal, conhecido como núcleo, numa fase líquida, que corresponde à criação de uma interface entre estas duas fases. Isto requer uma grande quantidade de energia, conhecida como energia superficial interfacial (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Em sobressaturações típicas do vinho, a precipitação é induzida por nucleação heterogénea (McKinnon et al., 1994).

A fase de crescimento, como o nome indica, é a fase em que após a formação de núcleos estáveis, os cristais se desenvolvem por ligação de iões potássio e bitartarato de potássio, nos pontos ativos das superfícies dos núcleos de cristalização já formados (Boulton, 1982).

Os principais fatores que influenciam a cinética de cristalização do bitartarato de potássio (THK) no vinho são o teor alcoólico, a temperatura, o pH e a matéria coloidal embora a força iônica também tenha um papel significativo (Malacarne et al., 2013).

O teor de álcool presente no vinho, é um factor condicionante na formação de bitartarato de potássio, pois estas duas variáveis são inversamente proporcionais, ou seja, à medida que o teor alcoólico aumenta, a solubilidade do bitartarato de potássio (THK) diminui (Ratsimba et al., 1989). Desta forma, o teor de álcool no vinho, como já foi referido anteriormente, aumenta durante a fermentação alcoólica o que provoca assim uma diminuição da solubilidade do bitartarato de potássio.

As temperaturas de armazenamento podem também ser decisivas no desencadeamento da cristalização do bitartarato, dado que a taxa de precipitação é maior quando o vinho é submetido a baixas temperaturas (Zoecklein 1988; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Um vinho sobressaturado será muito mais sensível a uma diminuição da temperatura, levando à precipitação do bitartarato de potássio (Lubbers et al., 1993).

A taxa e a extensão da precipitação também dependem do pH inicial do vinho (McKinnon et al., 1994). Contudo também coexistem no vinho diferentes equilíbrios relacionados com a dissociação do ácido tartárico (TH₂) e a precipitação do bitartarato de potássio (THK) e do tartarato de cálcio (TCa), equilíbrios esses que dependem do pH (Lasanta & Gómez 2012). Por exemplo, a percentagem de tartarato presente na forma de bitartarato de potássio (THK) é máxima a pH 3,7 que, em conjunto com outros fatores referidos anteriormente, faz com que a precipitação seja maior neste ponto (Zoecklein 1988).

Assim, qualquer tratamento a que vinho seja sujeito, que cause alterações no pH, tais como a ocorrência de uma fermentação maloláctica pode provocar a precipitação de bitartarato. Esta é a principal razão pela qual a estabilidade do bitartarato de potássio deve ser verificada após o armazenamento, imediatamente antes do engarrafamento (Zoecklein 1988).

A presença de determinadas macromoléculas no vinho pode também inibir o crescimento de núcleos e a conseqüente cristalização do THK. Estas macromoléculas, conhecidas como "colóides protectores", incluem taninos condensados e proteínas, e também glúcidos poliméricos, tais como pectinas e gomas, isto é, polissacáridos neutros. Além destas macromoléculas químicas, existem também polímeros mais complexos que podem ser responsáveis pela inibição da cristalização, como glicoproteínas, como por exemplo manoproteínas provenientes de leveduras (Lubbers et al., 1993).

Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006) o vinho tinto tem um teor em fenóis mais elevado do que o vinho branco e os seus taninos condensados têm um forte efeito inibidor.

O tartarato de cálcio (TCa) é um sal relativamente insolúvel, dez vezes menos solúvel do que o bitartarato de potássio (Tabela 1.2) (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

A estabilização dos vinhos para evitar a precipitação do tartarato de cálcio não é um processo fácil, pois a cristalização do bitartarato de potássio não induz a do tartarato de cálcio, pelo contrário, a cristalização do TCa pode induzir a do THK. Além disso, a prevenção da precipitação

de tartarato de cálcio é ainda mais complicada pelo facto de a solubilidade de TCa não ser muito sensível à temperatura (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

Embora a cinética de cristalização do TCa seja maior que a da THK, o tempo necessário para a nucleação espontânea do TCa é muito maior. Portanto, isto leva a que a precipitação de tartarato de cálcio geralmente ocorra no vinho após vários anos de envelhecimento (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

De forma a combater estas precipitações tartáricas, foram desenvolvidas diversas técnicas que são aplicadas actualmente durante o processo de vinificação para evitar a formação destes depósitos, reduzindo assim a concentração de potássio e ácido tartárico nos vinhos (Bosso et al. 2015).

1.4.1. Métodos de avaliação da estabilidade tartárica

Teste de permanência no frio

Este teste permite a avaliação qualitativa da estabilidade tartárica do vinho, visto que esta avaliação se baseia na observação visual da presença de cristais na amostra, após ser submetida a temperaturas de refrigeração (Malacarne et al., 2013).

O procedimento passa por colocar uma amostra de vinho, cerca de 100 mL a 0 °C (também pode ser avaliada a -4 °C) durante 4 a 6 dias. Após este período, a presença de cristais THK é avaliada visualmente (Bosso et al., 2016). Se houve a formação de cristais na amostra, o vinho é considerado instável, todavia se não se observar a formação de cristais, o vinho é considerado estável.

Este método tem a vantagem de ser simples, de fácil execução sem necessitar de nenhum equipamento específico, o que em termos de custos é bastante positivo. Em contrapartida é demorado na obtenção de resultados e por ser um teste de natureza qualitativa a precisão dos resultados é baixa, visto que o controlo de temperatura é difícil nos equipamentos de refrigeração, como é o caso do congelador e/ou frigorífico, podendo assim afectar o desenvolvimento dos cristais (Lasanta & Gómez, 2012). Na indústria este é o método tradicionalmente usado, contudo é algo desvantajoso porque cada vez mais a indústria quer obter resultados rápidos e concisos.

Teste de mini-contacto

Outro sistema de previsão da estabilidade tartárica baseia-se no teste de mini-contato, no qual o vinho a baixa temperatura é mantido em contato com o THK e a diminuição da condutividade é medida após determinado tempo (Benítez et al., 2003a).

O teste de mini-contato baseia-se na nucleação secundária dos cristais THK em que a cristalização é induzida pela adição de cristais THK ao vinho sob agitação contínua. O processo de cristalização pode ser monitorizado por pesagem (Müller-spath, 1977), medindo o teor de potássio, ou mais facilmente por condutimetria (Dunsford & Boulton, 1981). A perda de peso, a diminuição do teor de potássio ou a diminuição de condutividade estão positivamente correlacionados com o grau de instabilidade dos vinhos (Bosso et al., 2016).

Neste teste cerca de 100 mL de vinho são agitados de forma constante à temperatura de $0,0 \pm 0,1$ °C após a adição de 4 g/L de THK, por um período de 10 min. O resultado advém da diminuição da condutividade ($\mu\text{S/cm}$) durante o teste. Desta forma, a baixa temperatura e a presença de cristais THK agindo como núcleos de cristalização estimulam a precipitação tartárica em vinhos instáveis. Nesses casos, observa-se uma diminuição dos iões na solução e, conseqüentemente, uma diminuição da condutividade (Malacarne et al., 2013).

Uma empresa privada propôs também um teste de mini-contato que consiste em medir o decréscimo de condutividade do vinho a 0 °C, a 5-10 min após a adição de 10 g/L de cristais THK (Bosso et al. 2016). Quanto maior a diferença na condutividade, maior a instabilidade tartárica (Bosso et al. 2015). Deste modo o risco de sedimentação de THK é alto quando a diminuição de condutividade é maior que 40-45 $\mu\text{S/cm}$ (Angele, 1992).

Determinação da temperatura de saturação

A temperatura de saturação (T_s) do THK no vinho, representa o nível de saturação do vinho neste sal, e é medida pelo método politermal (Benítez et al., 2003b). Este método estudado por Wurdig, Muller e Friedrich em 1982, mede a condutividade elétrica durante um ciclo de temperaturas crescentes de duas amostras, um controle e outro com adição de THK, sendo T_s a temperatura na qual as condutividades das duas amostras são iguais (Lasanta & Gómez 2012).

A determinação da temperatura de saturação apesar de ser mais rápida tem ainda a vantagem de basear-se na solubilização de THK no vinho, que é um fenómeno muito mais fiável e reprodutível do que os métodos baseados em cristalização induzida que são menos reprodutíveis (Gonçalves et al., 2003).

1.4.2. Métodos de estabilização tartárica

Existem práticas enológicas que permitem a estabilização dos vinhos contra as precipitações tartáricas que consistem principalmente em técnicas subtrativas destinadas a remover uma quantidade variável de iões potássio e/ou bitartarato de acordo com o grau de instabilidade, como a estabilização por frio, troca iónica ou eletrodialise (Bosso et al. 2016).

Outra técnica também autorizada é o uso de aditivos que funcionam como inibidores do crescimento dos cristais THK e da formação de precipitado, como o ácido metatartárico,

manoproteínas extraídas de leveduras e gomas de celulose como a goma arábica ou carboximetilcelulose (CMC) (Malacarne et al., 2013). Por vezes, estes aditivos são também adicionados aos vinhos estáveis, para reduzir ainda mais os riscos de precipitação causados por alterações na estrutura coloidal durante o envelhecimento do vinho (Bosso et al. 2016).

Estabilização a frio

Entre as técnicas utilizadas nesta área, o tratamento pelo frio é actualmente o método mais aplicado. Esta técnica envolve o arrefecimento do vinho até uma temperatura próxima do seu ponto de congelação e o armazenamento em tanques isotérmicos durante um período de aproximadamente uma semana com a finalidade de provocar a precipitação do sal THK (Benítez et al. 2004). Posteriormente, é necessário proceder à filtração do vinho, por forma a retirar o precipitado deste.

No entanto, esta técnica é dispendiosa e nem sempre é totalmente eficaz, devido à precipitação ser por vezes incompleta, pois é um processo lento. Além disso, alguns enólogos pensam que as propriedades organoléticas do vinho são afetadas pela refrigeração, especialmente em vinhos com alto teor em polifenóis, devido à sua precipitação simultânea com os cristais THK (Artigas et al., 2003).

Por forma a garantir a completa estabilidade do vinho podem ser utilizados tratamentos adicionais como já referidos, o ácido metatartárico, manoproteínas, carboximetilcelulose, resinas de troca iónica e eletrodialise (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Troca iónica

O tratamento por troca iónica é baseado em resinas que possuem uma matriz polimérica e grupos funcionais ionizados ligados covalentemente, eletricamente neutralizados por iões móveis com carga eléctrica oposta que podem ser trocados com os iões do vinho, reduzindo assim a sua concentração no vinho e minimizando a precipitação de tartaratos (Ibeas et al., 2015).

Existem três maneiras diferentes de utilizar resinas de troca iónica na estabilização do tartarato no vinho: o uso de uma resina de troca catiónica na forma protonada onde os iões de potássio/cálcio no vinho são substituídos pelos protões da resina como H^+ , o uso de resina de troca aniónica na forma hidroxilo onde os iões OH^- são trocados pelo anião tartarato ou outros aniões, e um tratamento misto no qual potássio e tartarato são trocados por H^+ e OH^- , respectivamente, com duas resinas (uma catiónica e outra aniónica), com o objetivo de trocar um bitartarato de potássio por água (Ibeas et al., 2015).

Contudo o primeiro método, a troca catiónica, é o único autorizado na União Europeia (Regulamento (CE) n.º 606/2009) para o tratamento de vinhos, visto que os outros dois métodos

são susceptíveis de causar mudanças significativas nas características analíticas e organoléticas dos vinhos (Lasanta et al., 2013).

Electrodiálise

A eletrodiálise consiste na separação de iões de cargas diferentes, recorrendo a membranas permeáveis seletivas, sob a ação de um campo elétrico. Estas membranas correspondem a uma matriz polimérica, na qual os grupos funcionais ionizados são covalentemente fixados (Benítez et al., 2003b).

Neste processo o vinho circula em canais confinados por membranas seletivas de catiões e/ou aniões que pela ação de um campo elétrico externo normal às membranas, os iões são forçados a migrar para os elétrodos dando origem a uma corrente de vinho “pobre” em iões.

Existem dois tipos de membranas: as catiónicas, que são unicamente permeáveis aos catiões (K^+ Na^+ e Ca^{++}), e as aniónicas que são permeáveis unicamente aos aniões (HT^-) (Santos et al., 2000).

Uma característica importante desta técnica é o facto de, durante a circulação do vinho, existir uma área superficial reduzida de contacto com as paredes da membrana sendo esta uma vantagem por não interferir com os compostos do vinho que desempenham um papel importante nas suas propriedades organoléticas. Ao contrário da filtração ou processos de troca iónica onde o vinho se infiltra através de meios porosos com extensas áreas de superfície que conduzem frequentemente a fenómenos de adsorção de moléculas orgânicas que podem afectar as propriedades organoléticas dos vinhos (Gonçalves et al., 2003).

Outro ponto positivo desta técnica é a flexibilidade na extensão da extração dos iões de bitartarato de potássio que em contraste com a precipitação a frio onde a remoção de THK é fixa, a electrodiálise oferece a possibilidade de alcançar qualquer grau de remoção de THK através da variação do tempo de operação. No entanto, actualmente a indústria não faz uso deste potencial sendo executada com o estabelecimento de um grau fixo de desionização (Gonçalves et al., 2003). O efeito do tratamento com electrodiálise depende assim da taxa de desionização utilizada, que varia entre 24 e 26 % para os vinhos brancos e rosados, e de 8 para 13 % para os vinhos tintos (Moutounet et al., 1997).

Aditivos inibidores do crescimento de cristais

Podem ainda ser aplicados aditivos ao vinho que tem como função inibir o crescimento dos cristais THK e conseqüentemente a formação de precipitados no vinho. Todavia todos os aditivos usados para estabilizar os vinhos contra as precipitações de bitartarato de potássio têm alguns limites.

O ácido metatartárico (MTA) é muito eficaz em todas as tipologias de vinho, mas apresenta alguma instabilidade ao longo do tempo (Bosso et al., 2015).

As manoproteínas são obtidas da hidrólise da parede celular de leveduras que inibem a cristalização de sais de tartarato diminuindo a temperatura de cristalização (Guise et al., 2014). Porém estas têm uma eficácia variável dependendo composição de vinho e, portanto, necessitam de testes preliminares para avaliar a sua eficácia e para determinar a dose ideal, que é específica para o vinho a ser tratado (Bosso et al., 2015).

As gomas de celulose também apresentam alguma eficácia para prevenir a estabilidade tartárica, uma vez que são colóides protectores. Um exemplo, é o carboximetilcelulose (CMC) que é um derivado de celulose obtido por esterificação dos grupos álcool primário livres das unidades de glicopirranose ligadas por ligações glicosídicas β (1-4). O uso de CMC como produto enológico foi aprovado em Agosto de 2009 na União Europeia, no entanto já antes era aplicado na indústria de alimentos desde os anos quarenta como emulsionante (E466) (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Em enologia o CMC pode ser obtido com diferentes graus de substituição (DS) que corresponde ao número de unidades de glicose substituídas por grupos carboxílicos em relação às unidades totais de glicose, e com diferentes graus de polimerização (DP) que corresponde ao comprimento da cadeia, ou seja, ao número médio de unidades de glicose na molécula polimérica. Em teoria, a eficiência deste aditivo depende assim destes factores, sendo que para um CMC com um dado grau de polimerização, quanto maior for o grau de substituição mais eficaz é como colóide protector (Guise et al., 2014).

A adição de CMC no vinho faz com que as moléculas de CMC por serem carregadas negativamente, vão interagir com a superfície eletropositiva dos cristais de hidrogenotartarato de potássio (THK), onde os iões de potássio são acumulados, inibindo assim o seu crescimento (nucleação). O CMC também pode atuar complexando o potássio, diminuindo a quantidade de iões livres envolvidos na formação dos cristais, o que leva a que os cristais cresçam mais lentamente na presença de CMC, este efeito é devido à competição entre as moléculas CMC e os iões bitartarato (Crachereau et al., 2001).

Porém o uso deste inibidor tem a limitação de ser estável e eficaz em vinhos brancos mas, em contrapartida, afeta a estabilidade da cor em vinhos tintos (Bosso et al., 2015).

1.5. Estabilidade Corante

A cor é sem dúvida, um dos atributos mais importantes na qualidade de um vinho tinto.

Este parâmetro é o primeiro atributo avaliado no vinho pelos consumidores durante a degustação e é considerado muito importante, pois reflete algumas das suas virtudes e defeitos, como por exemplo a idade e se foi submetido a um processo específico de envelhecimento (Marquez et al., 2014). A cor pode também indicar se o vinho foi bem feito, ou seja, se foi produzido a um pH apropriado e a uma acidez adequada, sendo que inúmeros outros fatores podem afetar a cor do vinho, entre eles o método de vinificação, o tempo e condições de armazenamento (Jackson, 2008; Gómez-Plaza et al., 2002).

Os compostos fenólicos como antocianinas, monómeros e polímeros de flavanóis (catequinas e procianidinas), flavonóis e ácidos fenólicos desempenham um papel importante na estabilização da cor em vinhos tintos durante o armazenamento (García-Falcón et al., 2007).

Os compostos fenólicos são os principais agentes responsáveis pela cor do vinho, seja branco ou tinto e são extraídos gradualmente da casca da uva durante a maceração e transferidos para o mosto (Gómez-Plaza et al., 2002). Além de desempenharem um papel importante na estabilidade de cor, os compostos fenólicos influenciam também outras propriedades sensoriais, como adstringência e amargura (Marquez et al., 2014).

A composição do fenol é um aspecto importante nos vinhos tintos de alta qualidade e o seu comportamento está relacionado com o seu estado coloidal. Todos os vinhos têm essa característica, mas alguns mais que outros, especialmente quando os métodos de vinificação promovem a sua alta extração (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Esta matéria coloidal pode surgir numa maior concentração se as uvas forem danificadas devido a doenças, como por exemplo a podridão, se forem sujeitas a elevadas temperaturas durante a fermentação ou operações mecânicas excessivas como esmagamento, bombeamento, remontagem excessiva e agitação das borras, o que leva à extração forçada de moléculas instáveis como polissacarídeos não hidrolisados da casca da uva ou polissacarídeos exocelulares de fungos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). O seu perfil e concentração depende ainda da variedade da uva, grau de maturação e região onde as uvas foram cultivadas sendo também influenciado pelas diferentes práticas vitícolas e técnicas enológicas, como a utilização de aditivos, tais como enzimas, leveduras ou taninos durante o processo de vinificação (Cliff et al., 2007). Alguns autores afirmam que leveduras, mais especificamente as com baixo teor em β -glicosidase têm um efeito protetor na cor do vinho, enquanto que as enzimas facilitam a extração de polifenóis e a polimerização de taninos com antocianinas, evitando sua degradação e perda e, portanto, instabilidade de cor durante o armazenamento do vinho (Marín, 2003; Revilla & González-San José, 2003; Pérez-Lamela et al., 2007).

As antocianinas são as moléculas fenólicas mais importantes nos vinhos tintos responsáveis pela típica cor vermelha azulada dos mostos e vinhos jovens durante a fase inicial de produção (Marquez et al., 2014).

No entanto, as antocianinas são compostos altamente instáveis, muito suscetíveis à degradação. A sua extração durante a produção de vinho desencadeia numerosas reações que levam a mudanças na estrutura química, cor e estabilidade desses pigmentos que, por sua vez, se estabilizam devido à interação das antocianinas com outros compostos do vinho. A sua estabilidade é influenciada pela exposição ao oxigênio, à luz solar ou UV, mudanças no pH, temperatura, estrutura e concentração das antocianinas, presença de enzimas e de compostos complexantes, como outros flavonóides, ácidos fenólicos e íons metálicos, o que pode causar uma redução na sua cor (Czibulya et al., 2015).

Durante a etapa de vinificação e envelhecimento, a cor do vinho muda de acordo com o efeito destes compostos, sofrendo principalmente reações de copigmentação, cicloadição, polimerização e oxidação. À medida que o tempo de armazenamento na garrafa aumenta, estas reações ocorrem para formar substâncias mais estáveis que alteram as tonalidades inicialmente azuladas dos vinhos jovens para criar tons castanhos-avermelhados em vinhos envelhecidos uma vez que as antocianinas são progressivamente transformadas em novos pigmentos, por exemplo, piranoantocianinas (Marquez et al., 2014; Eiro & Heinonen, 2002).

A copigmentação é um fenómeno em que pigmentos e outros componentes orgânicos não coloridos como é exemplo os ácidos fenólicos, formam associações ou complexos moleculares de forma a proteger as formas coloridas mais sensíveis das antocianinas monoméricas estabilizando-as evitando assim a sua degradação (Rivero et al., 2019). A copigmentação da antocianina dá cores mais brilhantes, mais fortes e mais estáveis do que as expressas apenas pela antocianina (Eiro & Heinonen, 2002).

Contudo, foram identificados vários parâmetros que podem afetar o fenómeno de copigmentação no vinho tinto, tais como a temperatura, pH, força iónica e teor alcoólico, o dióxido de enxofre e o tempo de armazenamento (Dallas, 2006).

A adição de dióxido de enxofre no momento do esmagamento da uva potencia a transferência de polifenóis das peles para o mosto sendo que a estrutura da cor pode ser afetada de forma a refletir o efeito antioxidante do SO₂ por proteger o mosto da oxidação de polifenóis (Gómez-Plaza et al., 2002).

Também os agentes de colagem utilizados na estabilização proteica do vinho, podem ter efeitos adversos na cor dos vinhos, por exemplo a bentonite utilizada para a adsorção de proteínas pode indiretamente adsorver fenóis que se complexaram com proteínas e também se pode ligar a antocianinas, resultando numa perda de cor (Donovan et al., 1998).

Outro aspecto vital na obtenção de cor nos vinhos tinto é a duração da maceração, porém o tempo deve ser determinado de acordo com as variedades e espécies das uvas. Como a cor do vinho tinto se deve maioritariamente às antocianinas, um maior tempo de contato com a pele está diretamente correlacionado com uma maior concentração de antocianinas nos vinhos, no entanto parte das antocianinas pode também ser fixadas em partes sólidas, ser reduzido a uma forma incolor e participar em reações de condensação com outros compostos. A maceração pode também contribuir para a estabilidade da cor, se este processo não for prolongado (Gómez-Plaza et al., 2002).

Tal como as antocianinas, também os flavan-3-ols e taninos aumentam a sua concentração durante a fermentação em contacto com a pele sendo que os taninos continuam a ser extraídos mesmo após os níveis de antocianina atingirem um máximo. Uma característica dos taninos é que têm a capacidade de estabilizar as antocianinas e conseqüentemente a cor do vinho (Gómez-Plaza et al., 2002).

Um dos factores mais importantes que está relacionado com as mudanças de cor no vinho é a temperatura de armazenamento, visto que o vinho ao ser armazenado está sujeito a temperaturas que podem influenciar a degradação do pigmento e a polimerização. As reações que envolvem compostos fenólicos dependem da temperatura, e por isso o vinho evolui melhor quando armazenado a baixas temperaturas ao contrário de temperaturas mais altas que promovem mudanças mais rápidas na cor do vinho (Gómez-Plaza et al., 2002).

No armazenamento, além da temperatura também a duração do armazenamento é muito importante, visto que as mudanças mais rápidas na composição de cores do vinho ocorrem durante o primeiro ano de armazenamento. Essas alterações levam à diminuição de antocianinas causadas por três mecanismos diferentes, tais como a formação de polímeros mais estáveis por copigmentação com flavan-3-ols ou flavonóis, condensação direta entre antocianinas, flavanóis e acetaldeído mediadas entre eles e/ou a formação de copolímeros com a quinona da molécula de ácido cafeico e antocianinas (García-Falcón et al., 2007; Gómez-Plaza et al., 2002). Estas reações de polimerização que consistem na transformação de pigmentos monoméricos de antocianinas por formas oligoméricas mais estáveis surge tanto na presença como na ausência de oxigénio e ocorrem através do armazenamento de vinho em garrafas de vidro em condições essencialmente anaeróbicas (Gómez-Plaza et al., 2002).

A estabilidade da cor durante o envelhecimento está também relacionada com o grau de polimerização entre antocianinas e outros compostos fenólicos (Pérez-Lamela et al., 2007).

Em suma, o tempo de maceração e as condições de armazenamento são os principais factores que influenciam a cor do vinho (Gómez-Plaza et al., 2002).

Com vista a obter vinhos tintos jovens com as melhores características de cor e que se mantenham estáveis durante o armazenamento, as condições de vinificação mais adequadas envolvem a utilização de SO₂ no momento do esmagamento da uva, tempos de maceração longos, mas não em demasia, e temperaturas de armazenamento inferiores a 20 °C (Gómez-Plaza et al., 2002).

1.5.1. Métodos de avaliação da estabilidade corante

Teste de permanência no frio

A matéria corante nos vinhos tintos é parcialmente coloidal e, portanto, susceptível de precipitar (Figura 1.8) a baixas temperaturas (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

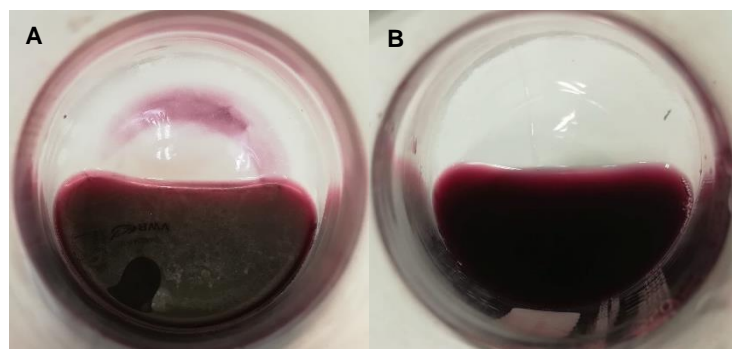


Figura 1.8: Vinho instável (A) e estável (B)

Assim, o teste que permite avaliar a estabilidade corante no vinho consiste na simulação de condições de baixa temperatura a que um vinho está sujeito durante o seu armazenamento. Este teste baseia-se no arrefecimento do vinho até uma temperatura próxima do seu ponto de congelação, cerca de 0 °C durante um período de 24 h, por forma a observar se existe precipitação de matéria corante para determinar se um vinho se encontra estável em relação à matéria corante (Enartis, s.d.).

Este método tanto pode ser usado como método para avaliar a estabilidade da matéria corante do vinho como para o estabilizar, passando assim da escala de laboratório para a escala industrial visto que são métodos semelhantes com a mesma finalidade.

1.5.2. Métodos de estabilização corante

Estabilização a frio

Este método além de resultar como tratamento para a estabilidade tartárica, também pode ser utilizado na obtenção da estabilidade corante, visto que a precipitação da matéria corante pode ocorrer no vinho quando sujeito a temperaturas mais baixas (Ribereau-Gayon, 1977).

Assim, de modo a obter uma melhoria na estabilidade corante, o vinho pode ser submetido a temperaturas abaixo de 0 °C, próximo ao seu ponto de congelamento durante algum tempo, por forma a desencadear a precipitação da matéria corante dita “instável”. Após esta precipitação o vinho deve ser clarificado por filtração para eliminar o precipitado obtido no fundo dos depósitos (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Esta técnica é eficaz na purificação de novos vinhos, bem como na estabilização da cor e clareza, particularmente em vinhos tintos engarrafados jovens (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Algumas das desvantagens desta técnica é que não é um tratamento permanente, dado que após alguns meses ou alguns anos de envelhecimento pode novamente surgir precipitação de matéria corante, alguns vinhos também parecem perder muito corpo, aroma e sabor após esta operação bem como o alto custo de compra e operação de equipamentos de estabilização a frio (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Colóides de proteção

De forma a evitar a precipitação de matéria corante nos vinhos, podem ser utilizados "colóides de proteção". Os colóides de proteção, como por exemplo a goma arábica e as manoproteínas, impedem a floculação de colóides instáveis, mantendo as partículas em suspensão (Gayon et al., 2006).

A goma arábica é uma mistura de polissacarídeos e glicoproteínas, que lhe conferem as propriedades de uma cola e ligante e a sua aplicação passa por prevenir a precipitação de fenóis e matéria corante nos vinhos tintos (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Tradicionalmente nos vinhos jovens, o problema da instabilidade de matéria corante era solucionado através da utilização de agentes de colagem com ovalbumina ou gelatinas, eliminando assim a matéria corante instável por floculação. A goma arábica é igualmente eficaz, embora atue impedindo a floculação da matéria corante instável, em vez de a eliminar (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A adição de goma arábica no vinho aumenta assim significativamente a estabilidade de cor da antocianina, no entanto um aumento na sua concentração pode levar à redução da sua eficácia devido a uma alteração na conformação das moléculas de goma que impedem a sua exposição às antocianinas (Mariod, 2018).

O tratamento através da utilização da goma arábica apresenta diversas vantagens, como por exemplo o facto de ter um efeito instantâneo e, portanto, adequado para vinhos que devem ser engarrafados rapidamente, não diminui a cor, pois não reduz a quantidade total de matéria corante e tem um efeito permanente. Esta última vantagem é muito importante visto que, apesar de nos métodos tradicionais a matéria corante coloidal ser eliminada, esta pode voltar a formar-se regularmente durante o envelhecimento, ou seja um vinho pode voltar a ser instável a baixas temperaturas apenas alguns meses depois de ser "colado" (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

1.6. Objectivo

Este trabalho que teve como objectivo a implementação de metodologias de análise de estabilidade proteica, tartárica e corante em vinhos que permitissem à Casa Relvas, obter a autonomia necessária a esta avaliação e reduzir assim os custos internos inerentes à subcontratação deste tipo de serviços.

Com vista a esta finalidade, este trabalho passou por:

- Caracterizar física e quimicamente os diversos vinhos utilizados neste estudo;
- Avaliar a estabilidade proteica dos vinhos branco e rosado na presença e ausência de tanino;
- Avaliar a estabilidade tartárica dos vinhos branco, rosado e tinto;
- Avaliar a estabilidade corante do vinho tinto;
- Determinar os métodos que melhor se adequam à determinação das diversas estabilidades dos vinhos;

Capítulo II

2. Materiais e Métodos

De forma a avaliar a estabilidade dos vinhos, foram selecionados 3 vinhos com características diferentes, sendo estes um vinho branco de 2017, um vinho rosado de 2017 e um vinho reserva tinto de 2016 originários da região do Alentejo, denominados ao longo do estudo de vinho branco, vinho rosado e vinho tinto, respectivamente.

Após recolha dos vinhos das cubas em que estavam armazenados, foi realizada a sua filtração em filtros com porosidade 0,45 µm, por forma a eliminar partículas em suspensão e tornar o vinho translúcido, posteriormente foram engarrafados em garrafas de vidro sob condições de assepsia.

Os métodos testados para avaliar a estabilidade dos vinhos neste estudo, já se encontravam previamente selecionados pela empresa Casa Relvas de forma a agilizar o processo.

2.1. Análise sumária dos vinhos

Foram realizadas análises dos parâmetros físico-químicos de cada vinho, sob a forma de produto semi-acabado, antes do início dos ensaios, com o objectivo de conhecer as características do vinho logo após o engarrafamento. A análise destes parâmetros foi realizada tendo em atenção que a temperatura ambiente deve estar próxima de 20 °C.

As metodologias utilizadas são as implementadas pela Casa Relvas, adaptadas e estabelecidas pelos métodos de referência.

2.1.1. Determinação do Dióxido de Enxofre Livre e Total

Para quantificar o SO₂ livre e total foi utilizado o método de arrastamento seguido de titrimetria: OIV-MA-AS323-04A (Regulamento (CEE) nº 2676/90), em que foram adicionados num balão de fundo redondo, 20 mL do respectivo vinho e 10 mL de H₃PO₄ 25 % (v/v), de seguida num balão periforme de dois colos adicionou-se 10 mL de H₂O₂ 0,3 % (v/v) e 3 gotas de indicador misto/universal. Após 15 min a borbulhar no aparelho de Frantz Paul da marca Verexa, o ácido sulfúrico formado foi titulado com uma solução de NaOH 0,01 M até apresentar uma cor azul esverdeada. O resultado, em mg/L, da fracção livre foi obtido através da seguinte equação,

$$\text{SO}_2 \text{ Livre} = V_{\text{titulante}} \times 16$$

Para a quantificação do SO₂ total o procedimento foi semelhante, no entanto neste caso levou-se o balão que continha a amostra à ebulição no mesmo período de tempo e foi posteriormente titulado obtendo através do mesmo cálculo a quantidade de SO₂ combinado, em mg/L, tendo em atenção que a quantidade de SO₂ total resulta da soma do SO₂ livre com o SO₂ combinado.

$$\text{SO}_2 \text{ total} = \text{SO}_2 \text{ livre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}$$

Na determinação do teor de SO₂ livre e total presente nos vinhos, foi utilizado também o método enzimático realizado pelo Y15 da BioSystems.

Inicialmente, foi colocada num poço de amostra cerca de 1 mL da amostra a analisar e depois colocou-se este na rack de amostras. De seguida programou-se a amostra no software informático seleccionando a técnica “FREE SULFITE” e “TOTAL SULFITE”, respectivamente de modo a dar seguimento à análise. Após terminar o equipamento forneceu diretamente o valor de SO₂ livre e SO₂ total, em mg/L, presentes na amostra.

2.1.2. Determinação da Acidez Volátil

A determinação da acidez volátil foi realizada por dois métodos distintos. Sendo um deles o método de destilação seguido de titrimetria, ou seja, composto por duas fases: destilação e titulação.

Na destilação foi utilizado o aparelho Cazenave Ferré, em que foi colocada água destilada num erlenmeyer e adicionado a um chapinador, 10 mL de vinho e 1 mL de H₂O₂ 0,1 % (v/v). De seguida, foi montada a ampola de retrogradação no conjunto e após se iniciar a ebulição foram recolhidos 100 mL de destilado, que posteriormente lhe foi adicionado 3 gotas de fenolftaleína e então titulado com uma solução de NaOH 0,1 N até se obter a cor rosa persistente. A quantidade de acidez volátil, em g/L, foi obtida através da seguinte equação,

$$\text{Acidez volátil} = V_{\text{titulante}} \times 0,60$$

Para determinar este parâmetro recorreu-se também ao método enzimático realizado de forma semi-automática pelo equipamento Y15 da BioSystems.

Inicialmente, foi colocada num poço de amostra cerca de 1 mL da amostra a analisar e depois colocou-se este na rack de amostras. De seguida programou-se a amostra no software informático seleccionando a técnica “ACETIC ACID” de modo a dar seguimento à análise. Após terminar o equipamento forneceu diretamente o valor de acidez volátil em g/L.

2.1.3. Determinação da Acidez Total

O método analítico utilizado nesta determinação foi a titrimetria com indicador de azul de bromotimol (Regulamento (CEE) nº 2676/90).

Para determinar a acidez total foram adicionados a um erlenmeyer 10 mL de amostra, 50 mL de água destilada e 3 gotas de azul de bromotimol que posteriormente foram titulados com uma solução de NaOH 0,1 N até a solução apresentar uma cor azul esverdeada. A acidez total, em g ácido tartárico/L, foi calculada através da seguinte equação,

$$\text{Acidez total} = V_{\text{titulante}} \times 0,75$$

2.1.4. pH

O parâmetro de pH foi determinado recorrendo ao método potenciométrico, utilizando o potenciômetro Crison GPL 21+ (Regulamento (CEE) nº 2676/90; OIV, 2018).

Foi previamente executada a calibração do potenciômetro antes de iniciar a análise, de seguida mergulhou-se o elétrodo de pH na amostra de vinho e procedeu-se à leitura, sendo o resultado final o valor de duas leituras consecutivas iguais.

2.1.5. Título Alcoométrico Volúmico Adquirido

Para determinar o teor de álcool em cada vinho recorreu-se ao ebuliómetro analógico, em que numa primeira fase executou-se a calibração do aparelho através da determinação do ponto de ebulição da água, tendo em atenção que a temperatura ambiente deve estar especialmente a cerca de 20 °C, visto que nesta análise a temperatura interfere com a análise. Após determinar a temperatura de ebulição da água, foi colocada na caldeira do ebuliómetro a amostra a analisar, após esta entrar em ebulição verificou-se a temperatura a que estabilizou e com auxílio do disco de cálculo leu-se diretamente o título alcoométrico volúmico adquirido (% vol).

2.1.6. Açúcares: Glucose-Frutose

Para quantificar açúcares como a glucose e frutose recorreu-se ao método enzimático executado pelo equipamento Y15 da BioSystems.

Inicialmente, foi colocada num poço de amostra cerca de 1 mL da amostra a analisar e depois colocou-se este na rack de amostras. De seguida programou-se a amostra no software informático selecionando a técnica "GLUCOSE + FRUTOSE" de modo a dar seguimento à análise. Após terminar o equipamento forneceu diretamente o valor total de glucose-frutose, em g/L, presentes na amostra.

2.1.7. Ácido L-Málico

Na determinação da quantidade de ácido L-málico presente nos vinhos, foi utilizado o método enzimático realizado pelo Y15 da BioSystems.

Inicialmente, foi colocada num poço de amostra cerca de 1 mL da amostra a analisar e depois colocou-se este na rack de amostras. De seguida programou-se a amostra no software informático seleccionando a técnica “L-MÁLICO” de modo a dar seguimento à análise. Após terminar o equipamento forneceu diretamente o valor de quantidade de ácido L-málico, em g/L.

2.1.8. Cor

A determinação da cor, em termos de tonalidade, foi realizada com base na observação visual dos diferentes vinhos.

O procedimento passa por introduzir uma quantidade do vinho até, no máximo, 1/3 do copo, de seguida inclina-se o mesmo cerca de 45° sobre um fundo branco por forma a avaliar a tonalidade do vinho, classificando-o de acordo com a seguinte lista:

Matriz	Cores
Vinho Branco	Amarelo Esverdeado
	Amarelo Citrino
	Amarelo Dourado
	Âmbar
Vinho Rosado	Rosa
	Salmão
	Laranja
Vinho Tinto	Vermelho Violeta
	Vermelho Ruby
	Vermelho Acastanhado
	Aloirado

2.2. Avaliação da Estabilidade Proteica

De forma a avaliar a estabilidade proteica dos vários vinhos (branco e rosado) efetuaram-se alguns ensaios que têm por base a medição da turbidez dos vinhos (NTU) quando submetidos a dois fatores que provocam instabilidade proteica: temperatura elevada e a presença de tanino.

Tendo em conta que o objectivo é perceber qual a quantidade necessária de agente colante para que cada vinho fique estável, foram previamente aplicadas no vinho diferentes doses de bentonite pura (Pluxbenton N), agente colante utilizado pela Casa Relvas, previamente hidratada

na proporção de 1:20 e deixou-se em contacto com o vinho cerca de 2 dias. Após este período de tempo o vinho foi filtrado a 0,45 µm com filtros de membrana nitrato de celulose. As doses de bentonite testadas foram 0, 40, 60 e 80 g/hL, selecionadas de acordo com os limites legais de aplicação deste agente.

Após o procedimento anterior foram preparados ensaios em que apenas foi analisado o vinho na presença das diferentes doses do agente colante e, também foram preparados ensaios com o vinho sujeito a diferentes doses do agente colante e na presença de tanino em que foram aplicados 250 g/hL de tanino gálico (Enartis Tan Blanc) que precipita proteínas e ajuda a perceber o efeito da presença da rolha no vinho, simulando o vinho engarrafado.

2.2.1. Sistema Bentocheck

Numa cuvete de amostra foram pipetados 10 mL de amostra dos ensaios dos vários vinhos descritos em 2.2 à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da sua turbidez (T1) em NTU no turbidímetro HANNA HI83749. De seguida, foi adicionado a essa cuvete 1 mL de reagente Bentocheck e aguardou-se 1 min antes de fazer a nova leitura (T2).

O vinho é considerado proteicamente estável se respeitar a respectiva condição,

$$T2 - T1 < 2 \text{ NTU} \quad (\text{ensaio na ausência de tanino})$$

$$T2 - T1 < 10 \text{ NTU} \quad (\text{ensaio na presença de tanino})$$

2.2.2. Banho-maria

Num erlenmeyer foram introduzidos 100 mL de amostra dos ensaios dos vários vinhos descritos em 2.2 e foi realizada à temperatura ambiente a leitura da turbidez inicial (T1) em NTU no turbidímetro HANNA HI83749 com o auxílio de uma cuvete de amostra.

Colocou-se a amostra de vinho no banho-maria termostático VWR a uma temperatura de 80 °C e posteriormente foram recolhidos 10 mL ao fim de 30 min, 2 h, 4 h e 6 h.

Após o arrefecimento da amostra à temperatura ambiente foi medida novamente a turbidez (T2).

O vinho considera-se proteicamente estável se respeitar a respectiva condição,

$$T2 - T1 < 2 \text{ NTU} \quad (\text{ensaio na ausência de tanino gálico})$$

$$T2 - T1 < 10 \text{ NTU} \quad (\text{ensaio na presença de tanino gálico})$$

2.3. Avaliação da Estabilidade Tartárica

Para avaliar a estabilidade tartárica dos três diferentes tipos de vinhos, o vinho foi exposto a factores que evidenciam essa instabilidade como baixas temperaturas e presença de bitartarato de potássio.

De forma a conhecer a quantidade de gomas que deve ser adicionada ao vinho para que este fique estável foram preparados ensaios utilizando Cellogum L (estabilizante tartárico à base de goma de celulose) e Citrogum (estabilizante coloidal à base de goma arábica), visto que são os estabilizantes tartáricos utilizados pela Casa Relvas.

O Cellogum L é uma solução aquosa à base de carboximetilcelulose sódica, com baixa viscosidade e elevado grau de substituição, específica para aplicação em enologia e conforme o Codex Enológico Internacional. Utilizada na preparação dos vinhos, inibe a formação e crescimento dos cristais de bitartarato de potássio e previne, assim, o aparecimento de precipitados na garrafa.

O Citrogum é uma solução de goma arábica, com um baixo teor em cálcio e é altamente eficaz na prevenção da precipitação de tartarato.

Foram preparados ensaios testando as doses 0, 100, 150 e 200 mL/hL de Cellogum L no vinho branco e rosado e 0, 50, 100, 150 e 200 mL/hL de Citrogum no vinho reserva tinto seleccionadas de acordo com os limites legais de aplicação.

2.3.1. Teste de permanência no frio

Foram realizados diversos ensaios em condições distintas, com o intuito de aferir qual o método que melhor se adequa à determinação da estabilidade tartárica.

Realizaram-se 3 ensaios em separado, em que se colocaram erlenmeyers contendo 100 mL de cada amostra descrita em 2.3 no congelador vertical Orima ORS 91 F em várias condições de tempo e temperatura: -4 °C durante 24 h, -4 °C durante 4 dias e 0 °C durante 4 dias.

Após este período deixou-se a amostra atingir a temperatura ambiente e por fim verificou-se se houve a precipitação de cristais representando estes a instabilidade da amostra.

2.3.2. Teste mini-contacto

Neste teste foi quantificada a estabilidade tartárica dos vinhos baseada na variação da condutividade do vinho com a adição de bitartarato de potássio.

A condutividade foi lida no equipamento MVP ICON da BIOCONTROL.

Para determinar este parâmetro foi medida a condutividade inicial (C1), em μS , a cerca de 0 °C sob agitação, em 100 mL de amostra de cada ensaio descrito em 2.3 e de seguida

adicionou-se 4 g/hL de bitartarato de potássio. Após 10 min em agitação a cerca 0 °C, foi novamente medida a condutividade (C2) em μS .

O vinho considera-se tartáricamente estável se respeitar a respectiva condição estabelecida pela Casa Relvas,

$$C2 - C1 \leq 30 \mu\text{S}$$

2.4. Avaliação da Estabilidade Corante

2.4.1. Teste de permanência no frio

De forma a avaliar a estabilidade corante, que neste caso foi apenas realizada no vinho tinto, foram colocados 100 mL da amostra a analisar num erlenmeyer e posteriormente deixou-se no congelador vertical Orima ORS 91 F a 0 °C durante 24 h. Após este período de tempo, deixou-se a amostra chegar à temperatura ambiente e observou-se.

O vinho considera-se instável se no fundo do erlenmeyer existir depósito e/ou precipitado.

Foram testadas as doses de 0, 50 e 100 mL/hL de Maxigum selecionadas de acordo com os limites de aplicação deste.

Maxigum é um estabilizante coloidal obtido a partir de *Acacia verek* que possui um grau elevado de eficácia na prevenção da precipitação de matéria corante.

Capítulo III

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise sumária dos vinhos

Antes do início dos ensaios foram realizadas análises dos parâmetros físico-químicos de cada vinho, com o objetivo de conhecer as características do vinho logo após o engarrafamento.

Os ensaios foram realizados utilizando três tipos de vinhos: vinho branco, vinho rosado e vinho tinto.

Na Tabela 3.1 são apresentados os valores correspondentes a todos os parâmetros analisados em cada vinho.

Tabela 3.1: Valores determinados nos parâmetros físico-químicos analisados em relação a cada vinho.

Parâmetro		Vinho Branco	Vinho Rosado	Vinho Tinto
Título alcoométrico volúmico adquirido (% vol.)		12,50	12,80	13,50
Acidez Total (g ácido tartárico/L)		5,25	5,36	5,51
Acidez Volátil (g ácido acético /L)	Destilação e titrimetria	0,21	0,36	0,60
	Enzimático	0,19	0,35	0,58
SO ₂ Livre (mg/L)	Arrastamento e titrimetria	42,88	38,08	35,20
	Enzimático	46,00	43,00	40,00
SO ₂ Total (mg/L)	Arrastamento e titrimetria	120,00	111,68	89,60
	Enzimático	125,00	119,00	101,00
pH		3,41	3,42	3,66
Ácido L-Málico (g/L)		1,08	0,73	0,03
Glucose-Frutose (g/L)		0,47	1,31	0,62
Cor		Amarelo Citrino	Rosa	Vermelho Ruby

Após observar os resultados obtidos para o vinho branco, rosado e tinto (Tabela 3.1), podemos afirmar que todos os parâmetros analisados se encontram dentro dos limites legais exigidos.

O título alcoométrico volúmico adquirido é determinado em % volúmica e de acordo como o *Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo III – 1 a)* o seu valor deve ser igual ou superior a 9 % vol., assim podemos concluir que os valores de TAVA obtidos para o vinho branco, rosado e tinto estão de acordo com os valores legislados, dado que foram obtidos os valores de 12,5, 12,8 e 13,5 % vol., respectivamente.

Os valores de acidez total, expressos em gramas de ácido tartárico por litro, obtidos no vinho branco, rosado e tinto foram de 5,25, 5,36 e 5,51 g/L de ácido tartárico, respectivamente, também se encontram dentro dos limites legais estabelecidos no *Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo III- 1 d)* que diz que deve ser não inferior a 3,5 g/L de ácido tartárico.

A acidez volátil, expressa em gramas de ácido acético por litro foi determinada em cada vinho por dois métodos distintos, o método enzimático e o método de destilação e titrimetria em que se pode observar que não houve diferenças significativas nos resultados obtidos em cada método visto se ter obtido resultados bastante semelhantes. Conforme o *Reg. (CE) nº 606/2009, Anexo I C- 1 b) e c)* os valores limite de acidez volátil são diferentes em relação ao tipo de vinho, nos vinhos brancos e rosados este parâmetro deve ser inferior ou igual a 1,1 g/L de ácido acético, contudo nos vinhos tintos este deve ser inferior ou igual a 1,2 g/L de ácido acético, o que demonstra estar de acordo com os valores obtidos nesta determinação por qualquer um dos dois métodos.

O teor de dióxido de enxofre total também foi determinado através de dois métodos: método de arrastamento e titrimetria e pelo método enzimático. Ao comparar os resultados obtidos nos dois métodos, podemos constatar que existiu uma ligeira diferença nos resultados. No vinho branco e rosado a diferença não é significativa, no entanto no vinho tinto podemos verificar uma diferença maior, que poderá estar associada ao facto de no método enzimático não ter sido usado o reagente descolorante que vem com o kit de reagentes, mas sim água destilada podendo assim interferir na quantificação deste parâmetro visto que ao contrário do vinho branco e rosado, o vinho tinto é muito mais opaco.

Os valores legalmente exigidos para o dióxido de enxofre total, ao contrário dos restantes parâmetros varia de acordo com a quantidade de açúcares, glucose + frutose, presentes no vinho. De acordo com o *Reg. (CE) nº 606/2009, Anexo I B – A. 1.a) e b)*, vinhos com teor de açúcares inferior a 5 g/L, que é o caso dos vinhos em estudo, os valores de dióxido de enxofre total deve de ser no máximo 150 mg/L no caso dos vinhos tintos e de 200 mg/L no caso dos vinhos brancos e rosados. Na observação dos resultados obtidos para os três vinhos, é possível afirmar que estes se encontram em conformidade com as condições descritas pelo regulamento referido anteriormente.

Tendo em conta o teor em açúcares, glucose + frutose obtido para cada um dos três vinhos é viável estabelecer a categoria em que se enquadram os vinhos utilizados neste estudo. Assim e de acordo com o *Reg. (CE) nº 607/2009, Anexo XIV – Parte B* podemos considerar os vinhos branco, rosado e tinto, na categoria dos vinhos secos, dado que o teor de açúcares é inferior a 4 g/L.

O dióxido de enxofre livre, o pH e o ácido L-málico são parâmetros que não estão legislados e por isso não existem limites legais exigidos. No entanto, em relação ao dióxido de enxofre livre, a empresa Casa Relvas tem estabelecido o valor mínimo de 30 mg/L de forma a garantir a proteção do vinho. Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que como os valores estão acima de 30 mg/L, esta condição foi respeitada. Por outro lado, para determinar este parâmetro foram utilizados também dois métodos diferentes: o método de arrastamento e titrimetria e o método enzimático, os quais não mostraram uma diferença significativa dando a indicação que ambos os métodos estão concordantes.

Da mesma forma, o ácido L-málico apesar de não legislado, a empresa Casa Relvas tem estabelecido que o teor em ácido L-málico deve ser o menor possível, preferencialmente perto de 0 g/L, esta condição tem o objectivo de evitar que na existência de possíveis bactérias lácticas o vinho não tenha ácido málico suficiente para ser convertido em ácido láctico.

Em relação ao pH dos vinhos, na bibliografia é descrito que os valores de pH dos vinhos variam de 2,8 a 4,0, e normalmente os vinhos tintos apresentam valores de pH mais elevados do que os vinhos brancos (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Jackson, 2008). Contudo na empresa também está estipulado que os vinhos alentejanos brancos e rosados, devem ter um pH de 3,2 a 3,6 e os tintos devem ter um pH compreendido entre 3,4 e 3,8.

Desta forma é possível afirmar que o pH dos três tipos de vinho estão dentro dos valores referidos e também podemos observar que o vinho branco e rosado têm um pH mais semelhante e o vinho tinto tem um pH mais alto que os restantes vinhos o que se encontra em conformidade com o descrito anteriormente.

3.2. Estabilidade Proteica

Os ensaios de estabilidade proteica, como referido anteriormente, apenas foram realizados no vinho branco e vinho rosado, cujos resultados foram analisados e comparados com os resultados obtidos pelo laboratório externo.

Os resultados apresentados são resultado da média de cerca de 20-30 réplicas no caso do método do bentocheck e cerca de 17 réplicas no método do banho-maria, sendo que todos os resultados foram sujeitos ao teste Q de rejeição de resultados com 90 % confiança.

3.2.1. Sistema Bentocheck

A utilização da solução Bentocheck é uma forma rápida e fácil de perceber se um vinho se encontra estável proteicamente. Esta solução ao ser adicionada no vinho provoca a desnaturação de possíveis proteínas instáveis no vinho que se traduz pelo aparecimento de turvação, podendo este ser quantificado. Posto isto e de forma a averiguar se é um bom método para determinação deste tipo de estabilidade, foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio foi adicionada ao vinho a solução de bentocheck e no segundo ensaios além de adicionada a solução de bentocheck, também foi adicionado tanino gálico a 5 %, introduzindo assim mais um factor destabilizante no vinho. Para determinar a dose de bentonite, Pluxbenton N, com a qual o vinho obtém a estabilidade foram testadas as doses de 0, 40, 60 e 80 g/hL de Pluxbenton N.

i) Vinho Branco

São apresentados na Tabela 3.2 os resultados obtidos em cada método testado e para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco.

Tabela 3.2: Variação de turbidez, com e sem tanino, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho branco e respectiva avaliação.

	Dose Pluxbenton N (g/hL)	Δ Turbidez (NTU)	Avaliação
Sem tanino	0	61,76 \pm 9,07	Instável
	40	0,99 \pm 0,61	Estável
	60	0,37 \pm 0,14	Estável
	80	0,27 \pm 0,12	Estável
Com tanino	0	74,29 \pm 15,64	Instável
	40	1,06 \pm 0,58	Estável
	60	0,69 \pm 0,25	Estável
	80	0,44 \pm 0,21	Estável

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.1 um gráfico que ilustra a turbidez em função da dose de bentonite aplicada no vinho.

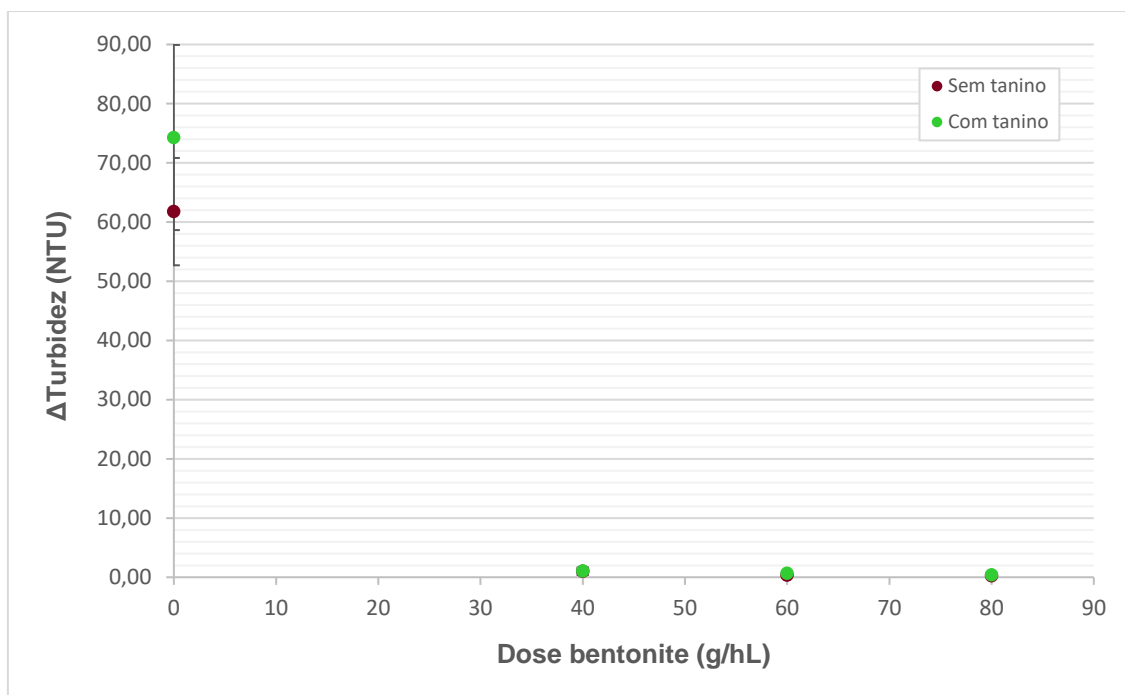


Figura 3.1: Efeito de diferentes doses de Pluxbenton N na variação de turbidez no vinho branco.

ii) Vinho Rosado

São apresentados na Tabela 3.3 os resultados obtidos em cada método testado e para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado.

Tabela 3.3: Variação de turbidez, com e sem tanino, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho rosado e respectiva avaliação.

	Dose Pluxbenton N (g/hL)	ΔTurbidez (NTU)	Avaliação
Sem tanino	0	0,30 ± 0,24	Estável
	40	0,16 ± 0,09	Estável
	60	0,14 ± 0,07	Estável
	80	0,18 ± 0,11	Estável
Com tanino	0	0,19 ± 0,11	Estável
	40	0,10 ± 0,05	Estável
	60	0,13 ± 0,10	Estável
	80	0,18 ± 0,10	Estável

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.2 um gráfico que ilustra a turbidez em função da dose de bentonite aplicada no vinho.

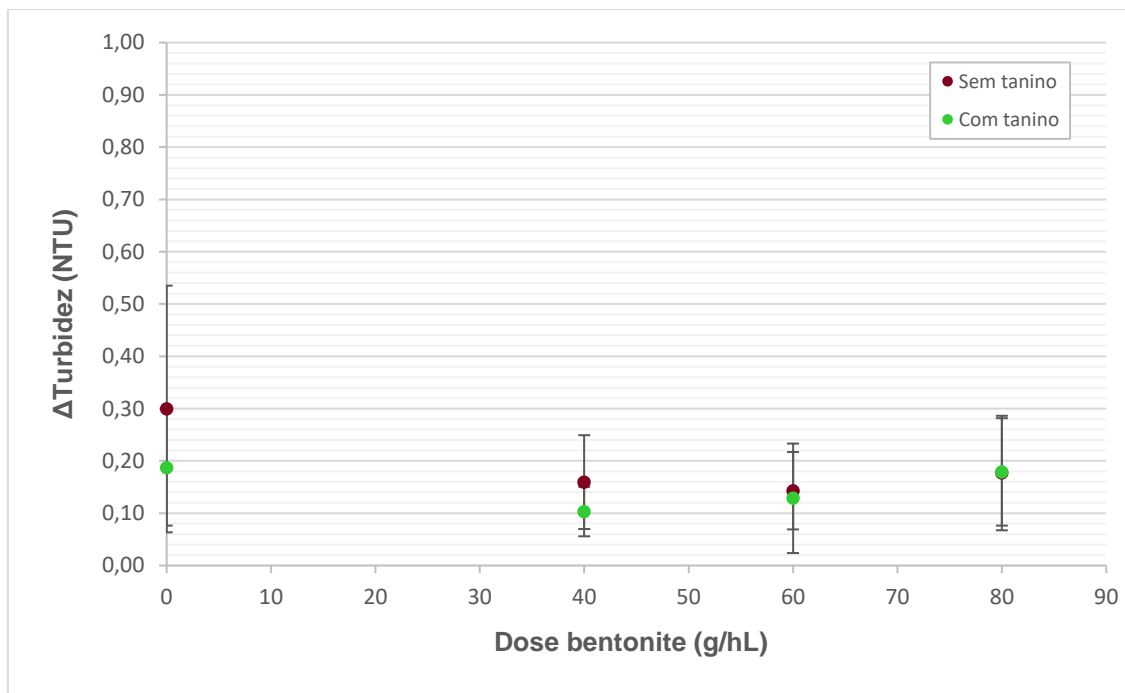


Figura 3.2: Efeito de diferentes doses de Pluxbenton N na variação de turbidez no vinho rosado.

Com base nos resultados obtidos pelo método do bentocheck com e sem tanino, podemos observar na Figura 3.1, que no vinho branco a adição de tanino causou um aumento de turvação, quando comparado com os valores obtidos sem a adição de tanino o que demonstra que é de facto verdade que o tanino provoca instabilidade no vinho visto que este composto é susceptível de se ligar às proteínas provocando a sua precipitação.

Também podemos constatar na Tabela 3.2 que quanto maior é a dose de bentonite aplicada no vinho, mais estável o vinho branco se encontra, uma vez que os valores de turvação diminuem com a dose de bentonite aplicada.

Em relação à avaliação da estabilidade do vinho branco, é possível estabelecer a dose mínima de bentonite à qual este vinho se encontra estável em ambos os métodos. No teste sem tanino, o valor máximo tabelado a que um vinho se encontra estável é de 2 NTU e no teste com tanino é de no máximo 10 NTU.

Tendo em conta estas condições seria sugerida assim a aplicação de 40 g/hL de Pluxbenton N, dado que o valor de turbidez obtido foi de $0,99 \pm 0,61$ NTU no caso do teste sem tanino e de $1,06 \pm 0,58$ NTU no teste com adição de tanino ao vinho.

Em contrapartida, no vinho rosado é possível observar na Figura 3.2 também uma diminuição na turbidez com o aumento da dose de bentonite aplicada, no entanto não é significativa uma vez que os valores de turbidez estão muito próximos uns dos outros. Esta situação pode ser explicada pelo facto de o vinho já se encontrar estável sem a aplicação de qualquer quantidade

de bentonite, já que ao analisar a Tabela 3.3 o valor de turbidez sem qualquer aplicação de bentonite foi de $0,30 \pm 0,24$ NTU no caso do teste sem tanino e de $0,19 \pm 0,11$ NTU no teste com adição de tanino, ou seja bastante inferior ao valor máximo em que um vinho está estável. Como estes valores de turvação estão muito baixos, demonstra que o vinho se encontra muito estável e por isso qualquer adição de bentonite não aumentará a estabilidade do vinho.

No entanto, como medida de segurança, a Casa Relvas prefere que seja aplicada uma dose mínima de bentonite por forma a garantir a estabilidade e consequentemente a qualidade do produto. Com base nisso, seria recomendada a aplicação de 40 g/hL de Pluxbenton N.

3.2.2. Banho-maria

Tal como no método anterior, neste método também foram avaliados diversos factores, como a utilização de tanino e ainda a avaliação do tempo de exposição à temperatura de 80 °C, para estabelecer quais as melhores condições que optimizam este método. Para determinar a dose de bentonite a que o vinho fica estável e comparar ambos os métodos foram testadas as doses de 0, 40, 60 e 80 g/hL de Pluxbenton N.

i) Vinho Branco

Na Tabela 3.4 são apresentados os resultados obtidos em cada método testado para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco, ao longo do tempo no banho-maria a 80 °C.

Tabela 3.4: Variação de turbidez ao longo do tempo, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho branco.

	Dose Pluxbenton N (g/hL)	Δ Turbidez (NTU)			
		30 min	2 h	4 h	6 h
Sem tanino	0	$0,35 \pm 0,39$	$0,24 \pm 0,15$	$0,68 \pm 0,33$	$3,23 \pm 2,00$
	40	$0,12 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,26$
	60	$0,20 \pm 0,16$	$0,23 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,21$	$0,54 \pm 0,35$
	80	$0,09 \pm 0,09$	$0,13 \pm 0,13$	$0,22 \pm 0,17$	$0,31 \pm 0,21$
Com tanino	0	$53,77 \pm 14,60$	$71,08 \pm 15,23$	$88,76 \pm 16,84$	$116,56 \pm 9,60$
	40	$0,64 \pm 0,46$	$3,12 \pm 2,82$	$7,76 \pm 5,15$	$10,67 \pm 5,97$
	60	$0,08 \pm 0,17$	$0,54 \pm 0,45$	$1,71 \pm 1,20$	$3,54 \pm 2,04$
	80	$0,02 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,46$	$1,46 \pm 1,13$

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.3 e Figura 3.4, os gráficos que ilustram os valores de turbidez ao longo do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco, sem e com tanino, respectivamente.

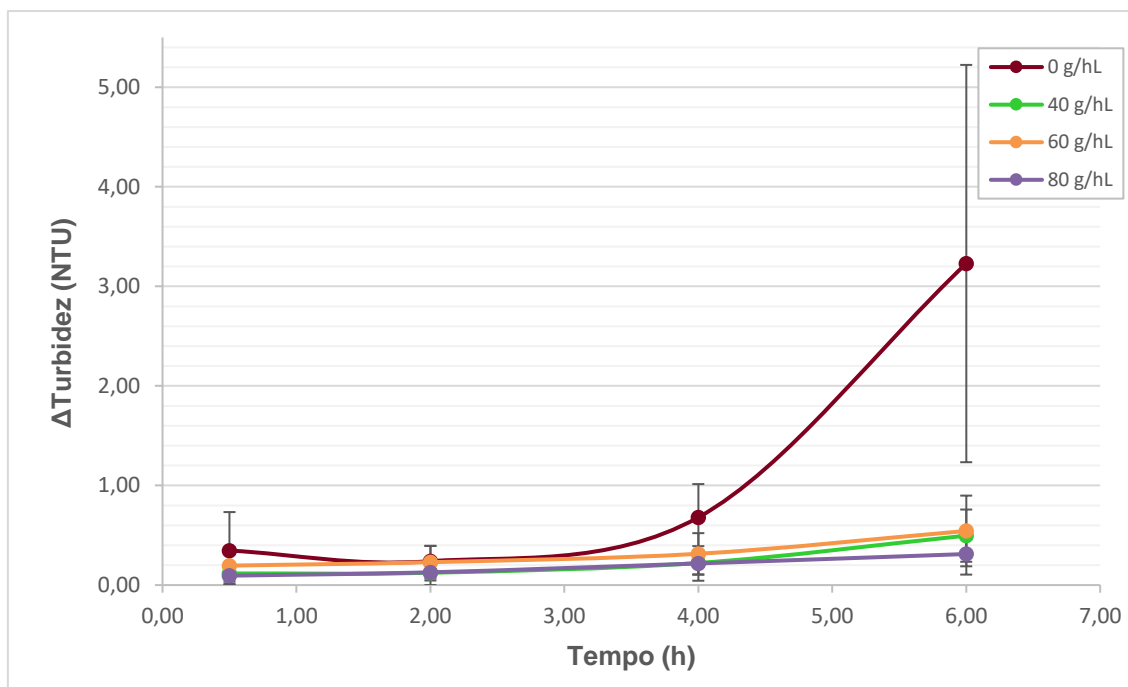


Figura 3.3: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C sem tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.

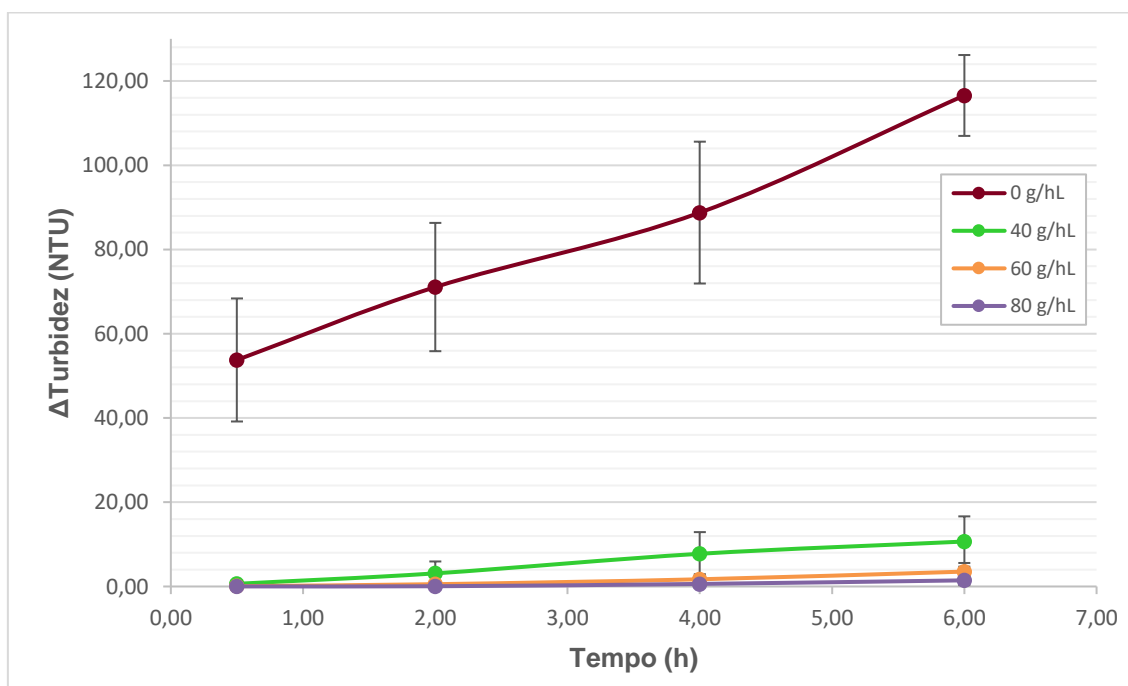


Figura 3.4: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C com tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.

i) Vinho Rosado

Na Tabela 3.5 são apresentados os resultados obtidos em cada método testado para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado, ao longo do tempo no banho-maria a 80 °C.

Tabela 3.5: Variação de turbidez ao longo do tempo, obtida para cada dose de Pluxbenton N testada no vinho rosado.

	Dose Pluxbenton N (g/hL)	Δ Turbidez (NTU)			
		30 min	2 h	4 h	6 h
Sem tanino	0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04
	40	0,03 ± 0,03	0,07 ± 0,09	0,15 ± 0,10	0,09 ± 0,07
	60	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,28 ± 0,19	0,19 ± 0,12
	80	0,04 ± 0,06	0,02 ± 0,05	0,12 ± 0,12	0,06 ± 0,07
Com tanino	0	0,08 ± 0,08	0,20 ± 0,11	1,62 ± 1,87	1,81 ± 1,65
	40	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,44 ± 0,42
	60	0,05 ± 0,06	0,06 ± 0,08	0,56 ± 0,60	1,23 ± 1,62
	80	0,06 ± 0,07	0,06 ± 0,07	0,34 ± 0,24	0,85 ± 0,81

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.5 e Figura 3.6, os gráficos que ilustram os valores de turbidez ao longo do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado, sem e com tanino, respectivamente.

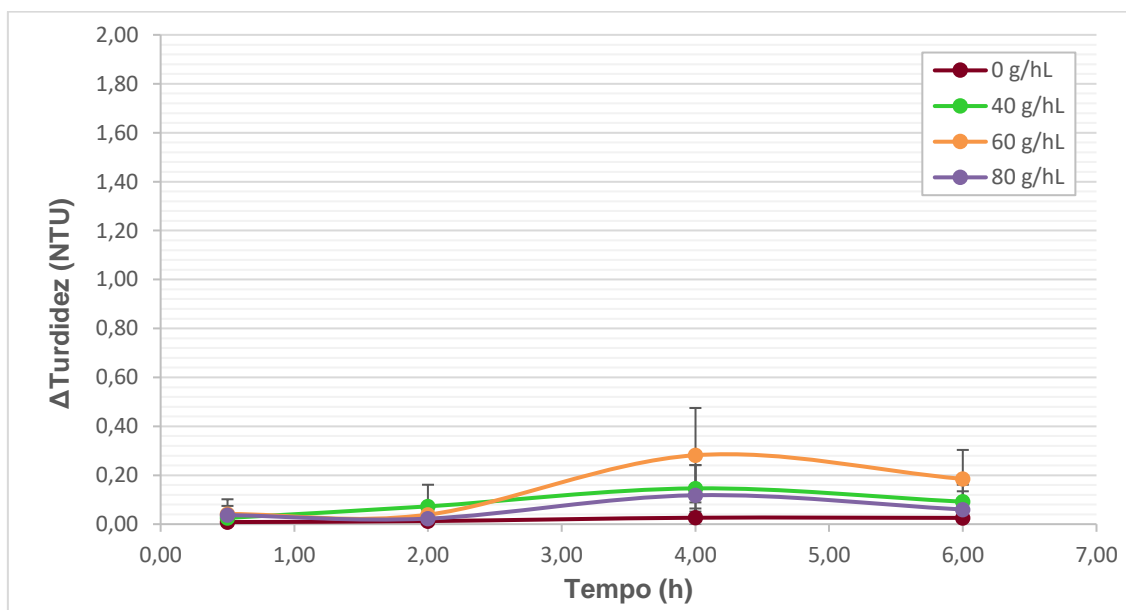


Figura 3.5: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C sem tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.

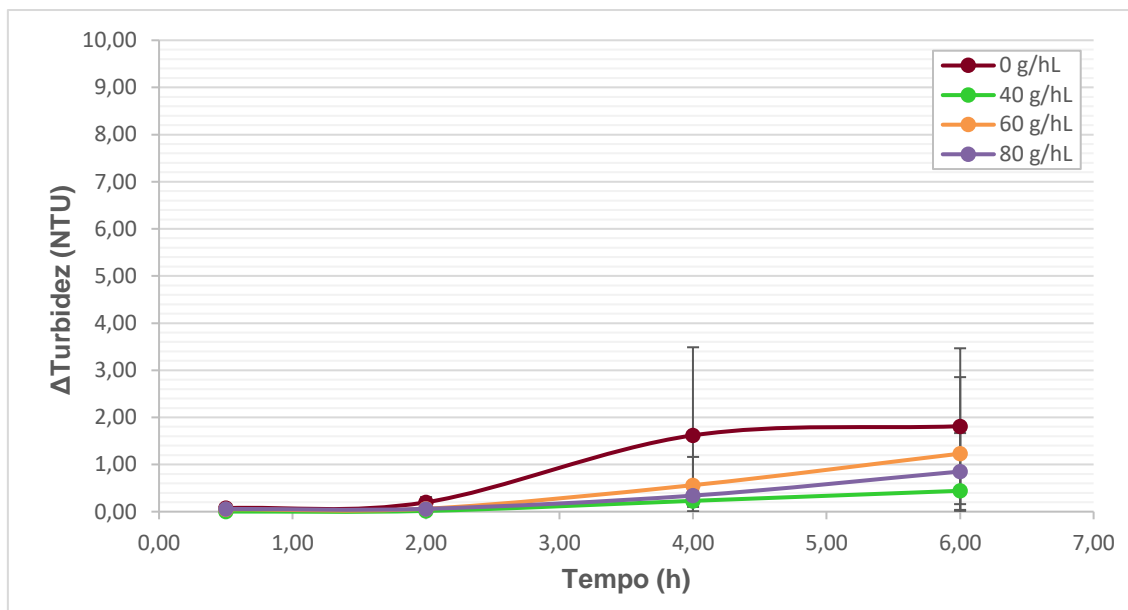


Figura 3.6: Variação de turbidez em função do tempo de permanência no banho-maria a 80 °C com tanino, para cada dose de bentonite aplicada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.

Considerando os resultados expostos na Tabela 3.4 e Tabela 3.5, é possível constatar que os resultados sem e com adição de tanino ao vinho apresentaram alguma diferença, os valores que resultaram do teste do banho-maria com tanino foram mais altos quando comparados com os obtidos sem adição de tanino. Como já foi referido anteriormente, o tanino causa instabilidade no vinho, e como a instabilidade é evidenciada pelo aumento de turvação no vinho justifica assim que os valores obtidos, medidos em NTU, tenham sido mais altos no teste com tanino.

No caso do vinho branco, ao observar a Figura 3.3 e Figura 3.4, que corresponde ao método do banho-maria a 80 °C sem e com tanino, respectivamente, vê-se uma evolução na estabilidade do vinho ao longo do tempo de permanência no banho a 80 °C tanto sem, como com tanino.

É possível observar que ao longo do tempo no banho, o valor de turvação aumenta, ou seja, a estabilidade do vinho diminui. Assim, é viável presumir que, quanto mais tempo o vinho estiver sujeito à temperatura de 80 °C mais fica instável, sendo que as 6 h foi o tempo a que o vinho apresentou uma menor estabilidade. Isto demonstra que a estabilidade do vinho é influenciada pelo calor e consequentemente pelo tempo em que está exposto a este.

Por outro lado, também se pode constatar que tal como nos outros métodos, a estabilidade aumenta com o aumento da dose de bentonite aplicada no vinho, tornando assim possível indicar a quantidade de bentonite a que o vinho obtém a estabilidade proteica.

Na análise sem tanino, considerando os valores de turvação da Tabela 3.4, o vinho branco apresentou numa mesma dose, resultados estáveis e instáveis, por exemplo sem adicionar qualquer bentonite, os resultados foram inferiores a 2 NTU ao longo das 4h, o que indica que o vinho se encontrava estável, no entanto às 6h no banho o vinho passou a estar instável apresentando o valor de $3,23 \pm 2,00$ NTU.

Tendo em conta este resultado de instável às 6 h e que na dose seguinte de 40 g/hL de Pluxbenton N, às 6 h o vinho já indicou um valor de $0,50 \pm 0,26$ NTU, inferior a 2 NTU, segundo este método sem tanino, seria recomendada a aplicação de 40 g/hL de Pluxbenton N.

No entanto, ao avaliar os resultados obtidos com a adição de tanino, observa-se que ao contrário dos resultados anteriores com a dose de 40 g/hL de Pluxbenton N, o vinho às 6h está instável apresentando um valor de $10,67 \pm 5,97$ NTU, e por isso superior a 10 NTU.

Em suma, e tendo em conta estes dados, seria recomendada a aplicação de 60 g/hL de Pluxbenton N, visto que na presença de tanino o vinho branco está mais sujeito a instabilidade devido ao facto de o tanino provocar a precipitação de proteínas e por isso este método permite maior segurança em termos de estabilidade proteica.

Estes resultados, quando comparados com os resultados obtidos no ensaio do Bencotcheck, não se encontram de acordo, visto que anteriormente com a dose de 40 g/hL de Pluxbenton N o vinho já era considerado estável. Isto poderá por em causa se a avaliação da estabilidade do vinho a 80 °C durante 6 h será levar o vinho a um extremo desnecessário.

Ao analisar os resultados do vinho rosado representados na Figura 3.5 e Figura 3.6, observa-se que ao longo do tempo de permanência no banho a 80 °C tanto sem, como com tanino há um aumento da instabilidade do vinho. Contudo esta variação foi menor, em comparação com o que sucedeu com o vinho branco, especialmente sem adição de tanino ao vinho, pois neste caso os valores de turvação não variaram muito, mantendo-se um tanto estáveis e próximos uns dos outros, ao contrário do método com a adição de tanino, cuja variação fez-se notar mais, sendo possível observar um aumento gradual da turvação e assim da instabilidade proteica.

Tal como anteriormente, para o outro vinho, neste vinho também é possível verificar, mesmo não sendo esta alteração muito notável, que ao aumentar a dose de bentonite, a turvação do vinho diminui ficando assim o vinho mais estável.

Sem aplicar qualquer quantidade de bentonite no vinho rosado, sem e com tanino, ambos os resultados foram estáveis, mesmo após as 6 h exposto ao banho-maria a 80 °C, cujos resultados foram de $0,03 \pm 0,04$ NTU e $1,81 \pm 1,65$ NTU, respectivamente. À semelhança do ensaio com o bencotcheck também neste ensaio é recomendada a aplicação de 40 g/hL de Pluxbenton N no vinho rosado, visto que o que prevalece é a segurança da qualidade do vinho.

Por forma a validar estes resultados obtidos pelo método do banho-maria a 80 °C durante 6 h, foi pedido a um laboratório externo que executasse em paralelo, ambos os métodos (sem e com tanino) com estes vinhos, cujos resultados (Anexo I) foram bastante semelhantes. Os resultados mostraram que, por exemplo no vinho branco com aplicação de 40 g/hL de Pluxbenton N, também foi obtida instabilidade com tanino às 6 h. Contrariamente, no vinho rosado, sem aplicação de bentonite, ou seja, 0 g/hL de Pluxbenton N, o resultado sem tanino às 6 h foi de instável, ao contrário do resultado obtido internamente, no entanto verificamos que a partir das 4 h no banho, as leituras de turvação aumentam de forma bastante rápida ao contrário das restantes, o que pode dar a indicação de um possível erro.

Após estes resultados, a empresa decidiu optar por utilizar este método do banho-maria a 80 °C com a aplicação de tanino, e realizar o ensaio durante as seis horas pois este teste mostrou

que pode desta forma servir como um bom indicador da estabilidade no vinho, visto que leva o vinho a condições extremas, garantindo assim a estabilidade do mesmo sob quaisquer condições a que possa estar sujeito desde o engarrafamento, expedição e transporte até ao consumidor.

Contudo, também seria importante avaliar por outro lado, se a utilização deste método nestas condições não poderá dar uso a uma utilização excessiva de bentonite, visto que foi demonstrado por Lira et al. (2015) que a bentonite tem efeitos negativos no aroma do vinho, sendo importante a otimização da dose e o momento da sua aplicação. Neste artigo, os resultados mostraram que a adição de bentonite durante a fermentação (especialmente no meio e fim) reduziu a dose total necessária para a estabilização proteica de vinhos e manteve as suas características sensoriais (Lira et al., 2015).

3.3. Estabilidade Tartárica

Após realizados os diferentes ensaios para determinar a estabilidade tartárica nos três vinhos: vinho branco, vinho rosado e no vinho tinto, os resultados foram analisados e comparados com os resultados obtidos pelo laboratório externo.

3.3.1. Teste de permanência no frio

Um dos ensaios realizados foi o teste de permanência do frio, no qual o vinho foi submetido a três condições diferentes: -4 °C durante 24 h, -4 °C durante 4 dias e 0 °C durante 4 dias.

i) Vinho Branco

Para determinar a dose de Cellogum L com a qual vinho branco obtém a estabilidade tartárica, foram realizados ensaios testando as doses de 0, 100, 150 e 200 mL/hL de Cellogum L.

Após atingir a temperatura ambiente foram obtidos os seguintes resultados qualitativos apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Cellogum L testada no vinho branco.

Dose de Cellogum L (mL/hL)	Avaliação		
	-4 °C, 24 h	-4 °C, 4 dias	0 °C, 4 dias
0	Instável *	Instável	Instável
100	Estável	Estável	Estável
150	Estável	Estável	Estável
200	Estável	Estável	Estável

Nota: Instável- Com cristais; Estável- Sem cristais
*cristais pouco desenvolvidos

ii) Vinho Rosado

Para determinar a dose de Cellogum L com a qual vinho rosado obtém a estabilidade tartárica, foram realizados ensaios testando as doses de 0, 100, 150 e 200 mL/hL de Cellogum L.

Após atingir a temperatura ambiente foram obtidos os seguintes resultados qualitativos apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Cellogum L testada no vinho rosado.

Dose de Cellogum L (mL/hL)	Avaliação		
	-4 °C, 24 h	-4 °C, 4 dias	0 °C, 4 dias
0	Instável *	Instável	Instável
100	Estável	Estável	Estável
150	Estável	Estável	Estável
200	Estável	Estável	Estável

Nota: Instável- Com cristais; Estável- Sem cristais
*cristais pouco desenvolvidos

iii) Vinho Tinto

Para determinar a dose de Citrogum com a qual vinho tinto obtém a estabilidade tartárica, foram realizados ensaios testando as doses de 0, 50, 100, 150 e 200 mL/hL de Citrogum.

Após atingir a temperatura ambiente foram obtidos os seguintes resultados qualitativos apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Avaliação da estabilidade tartárica em função da dose de Citrogum testada no vinho tinto.

Dose de Citrogum (mL/hL)	Avaliação		
	-4 °C, 24 h	-4 °C, 4 dias	0 °C, 4 dias
0	Instável *	Instável	Instável
50	Estável	Estável	Estável
100	Estável	Estável	Estável
150	Estável	Estável	Estável
200	Estável	Estável	Estável

Nota: Instável- Com cristais; Estável- Sem cristais
*cristais pouco desenvolvidos

Ao analisar os resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados para cada vinho apresentados nas Tabela 3.6, Tabela 3.7 e Tabela 3.8, observa-se que todos os métodos apresentaram resultados semelhantes em termos de avaliação da estabilidade tartárica.

Desta forma, é assim possível estabelecer a dose do respectivo estabilizante tartárico que permite tornar o vinho tartáricamente estável.

Tendo em conta a análise dos resultados, o vinho branco e rosado está estável com a aplicação de 100 mL/hL Cellogum L e no caso do vinho tinto é necessária a aplicação de 50 mL/hL de Citrogum.

Contudo, apesar de em todos os ensaios se ter obtido o mesmo resultado, existiram diferenças no que foi observado em cada ensaio. Quando o vinho foi sujeito a -4 °C durante 24 h observou-se a presença de cristais menos desenvolvidos quando comparado quando o vinho foi sujeito a -4 °C durante 4 dias e 0 °C durante 4 dias que permitiu uma melhor visualização dos cristais. Este fenómeno pode dever-se ao facto de como o vinho foi mantido no frio durante um curto período de tempo, os cristais tiveram pouco tempo para se desenvolver.

Por isso e tendo em conta que este método é um método qualitativo e assim sujeito a alguns erros, devido à sua avaliação através da observação, os métodos de permanência no frio que permitem uma melhor avaliação da estabilidade tartárica, são aqueles em que o vinho foi mantido a -4 °C durante 4 dias e 0 °C durante 4 dias.

No entanto, como estes dois métodos demoram algum tempo, mais precisamente 4 dias até obter o resultado, a nível industrial isto não responde às necessidades, uma vez que é necessário obter resultados rápidos e fiáveis, num curto espaço de tempo. Desta forma, foi testado o método de mini-contacto, visto que é um método quantitativo e rápido.

3.3.2. Teste mini-contacto

Neste teste as doses testadas foram as mesmas que para o teste de permanência no frio e foi aplicado 4 g/hL de bitartrato de potássio. Os resultados apresentados são resultado da média de cerca de 12 réplicas, sendo que todos os resultados foram sujeitos ao teste Q de rejeição de resultados com 90 % confiança.

i) Vinho Branco

Após leitura da condutividade inicial e ao fim de 10 min a 0 °C, foi calculada a variação da condutividade durante os 10 min, cujos resultados são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Variação de condutividade para cada dose de Cellogum L testada no vinho branco e respectiva avaliação.

Dose Cellogum L (mL/hL)	Δ Condutividade (μ S)	Avaliação
0	171 \pm 28	Instável
100	20 \pm 7	Estável
150	22 \pm 6	Estável
200	17 \pm 4	Estável

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.7 um gráfico que ilustra a condutividade em função da dose do respectivo estabilizante tartárico aplicado.

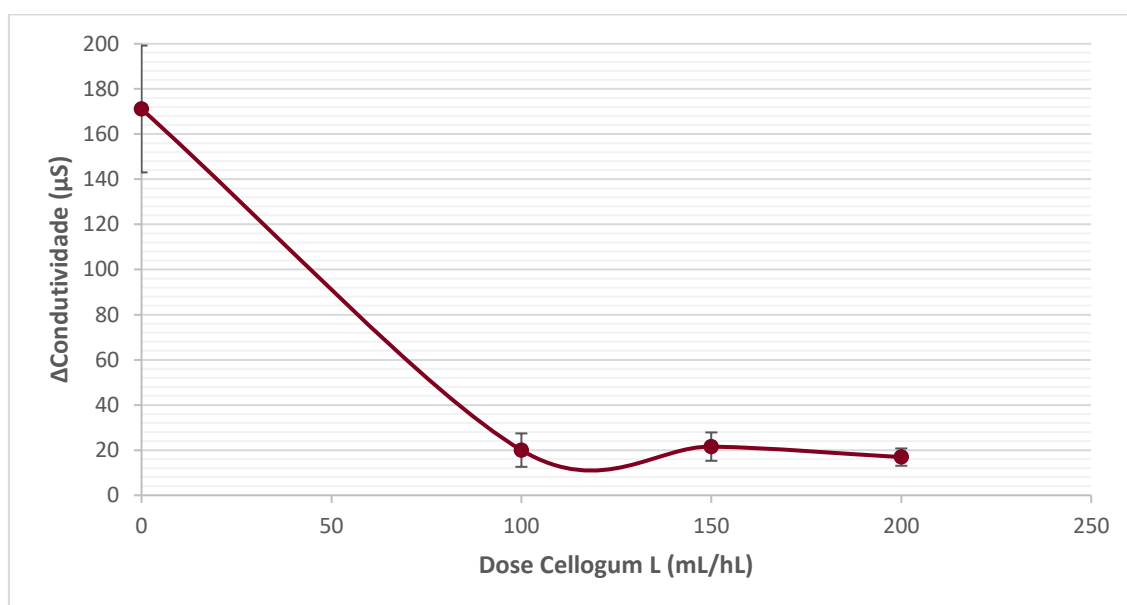


Figura 3.7: Variação de condutividade em função da dose de Cellogum L testada no vinho branco e respectivos desvios-padrão.

ii) Vinho Rosado

Após leitura da condutividade inicial e ao fim de 10 min a 0 °C, foi calculada a variação da condutividade durante os 10 min, cujos resultados são apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Variação de condutividade para cada dose de Cellogum L testada no vinho rosado e respectiva avaliação.

Dose Cellogum L (mL/hL)	Δ Condutividade (μ S)	Avaliação
0	176 \pm 27	Instável
100	22 \pm 8	Estável
150	23 \pm 9	Estável
200	19 \pm 6	Estável

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.8 um gráfico que ilustra a condutividade em função da dose do respectivo estabilizante tartárico aplicado.



Figura 3.8: Variação de condutividade em função da dose de Cellogum L testada no vinho rosado e respectivos desvios-padrão.

iii) Vinho Tinto

Após leitura da condutividade inicial e ao fim de 10 min a 0 °C, foi calculada a variação da condutividade durante os 10 min, cujos resultados são apresentados na Tabela .

Tabela 3.11: Variação de condutividade para cada dose de Citrogum testada no vinho tinto e respectiva avaliação.

Dose Citrogum (mL/hL)	Δ Condutividade (μ S)	Avaliação
0	59 \pm 16	Instável
50	26 \pm 9	Estável
100	24 \pm 14	Estável
150	22 \pm 9	Estável
200	20 \pm 8	Estável

Para uma melhor visualização dos resultados, é apresentado na Figura 3.9 um gráfico que ilustra a condutividade em função da dose do respectivo estabilizante tartárico aplicado.

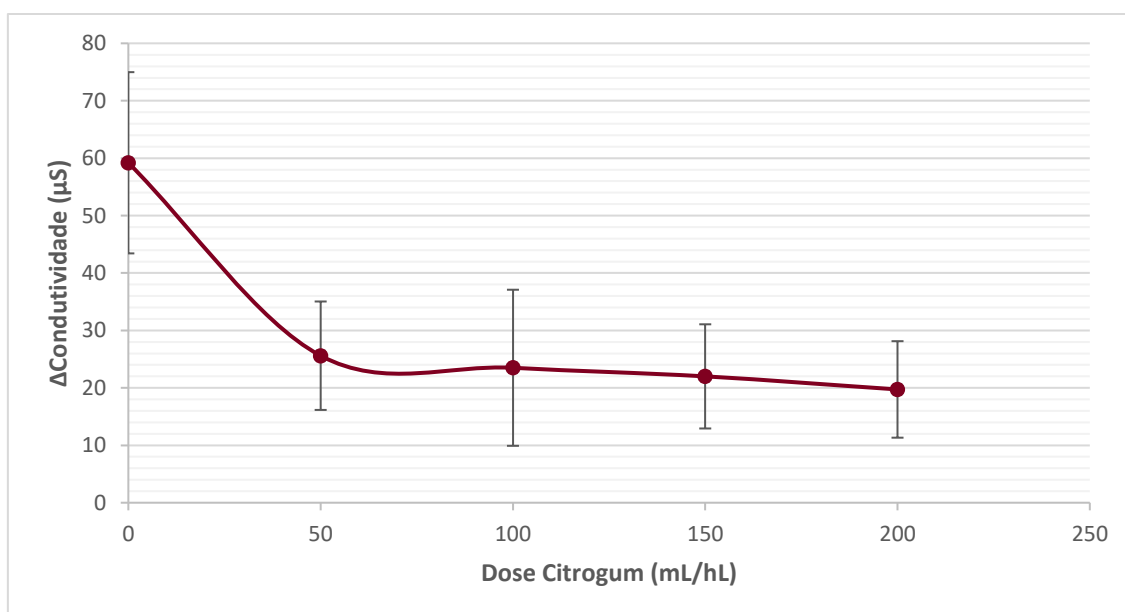


Figura 3.9: Variação de condutividade em função da dose de Citrogum testada no vinho tinto e respectivos desvios-padrão.

Com base nos resultados obtidos por este método em qualquer um dos três vinhos, verificamos que pela análise da Figura 3.7, Figura 3.8 e Figura 3.9, como seria de prever, a condutividade diminui à medida que a dose de estabilizante aumenta, ou seja, quanto maior for a concentração de estabilizante tartárico adicionada ao vinho mais estável tartaricamente o vinho fica.

O valor máximo de condutividade a que um vinho se encontra estável é de 30 μ S e foi estabelecido pela Casa Relvas ao avaliar diversas referências.

Desta forma ao analisar os resultados obtidos em cada um dos vinhos, verificamos que no vinho branco (Tabela 3.9) a dose de Cellogum L necessária para estabilizar o vinho tartaricamente é de 100 mL/hL, visto apresentar um valor de condutividade de $20 \pm 7 \mu\text{S}$ que é inferior a $30 \mu\text{S}$.

Da mesma forma, no vinho rosado (Tabela 3.10), no mínimo deve ser aplicada a dose de 100 mL/hL de Cellogum L cujo valor de condutividade obtido foi de $22 \pm 8 \mu\text{S}$. No vinho tinto (Tabela 3.11) foi testado outro estabilizante, o Citrogum, o qual torna este vinho tartaricamente estável com a aplicação de no mínimo 50 mL/hL de Citrogum correspondente ao valor de condutividade de $26 \pm 9 \mu\text{S}$.

Desta forma, é possível afirmar que tal como no estudo de Gerbaud et al. (2010) verificou-se que a CMC inibe a cristalização de KHT e o seu efeito inibitório aumentou exponencialmente com o aumento da concentração de CMC, o que demonstra que a CMC tem um forte efeito inibidor sendo assim eficiente na estabilidade tartárica (Gerbaud et al., 2010).

Por comparação dos resultados obtidos com os resultados do laboratório externo (Anexo I e II), é possível afirmar que estes corroboram estes resultados, uma vez que em termos de avaliação, os resultados foram os mesmos, ou seja, as doses de aplicação recomendadas de Cellogum L no vinho branco e rosado foi de 100 mL/hL e de Citrogum no vinho tinto foi de 50 mL/hL, o que dá a indicação que este método pode assim ser utilizado na determinação da estabilidade tartárica dos vinhos.

Ao analisar os desvios-padrão obtidos em cada ensaio, é de destacar que os valores se encontram um pouco altos. Este facto pode dever-se às condições em que este método foi executado. Um exemplo é a temperatura inicial e final a que é feita a leitura da condutividade, pois como é sabido, a condutividade depende da temperatura e devido à ausência de um equipamento que permita ler a condutividade no momento certo, ou seja a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, esta pode variar, que neste caso foi o que aconteceu, devido à impossibilidade de manter a temperatura.

De forma a executar este método o mais isento de desvios e assim similar com o que um equipamento, por exemplo o CheckStab faz, que é o arrefecimento da solução até $0 \text{ }^\circ\text{C}$, lendo imediatamente a condutividade e mantendo a temperatura a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo período de tempo em ensaio. Neste caso esse arrefecimento da solução foi feito num congelador até cerca de $0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, foi lida a condutividade e mantida num agitador cuja temperatura foi controlada com gelo. Após os 10 min, ou seja, quando foi realizada a segunda leitura a temperatura já não era igual à inicial, no entanto foi controlada de forma a que fosse cerca de $0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Devido a esta diferença de temperaturas inicial e final, os valores podem assim ter sido condicionados.

3.4. Estabilidade Corante

Para determinar a dose de Maxigum com a qual o vinho tinto obtém a estabilidade em relação à matéria corante, foram realizados ensaios testando as doses de 0, 50 e 100 mL/hL de Maxigum.

3.4.1. Teste de permanência no frio

Neste ensaio o vinho testado é o vinho tinto, este foi mantido a 0 °C durante 24 h sendo que para cada ensaio foram realizadas seis réplicas.

Na Tabela 3.12 são apresentados os resultados de cada ensaio após este período de tempo.

Tabela 3.12: Avaliação qualitativa para cada dose de Maxigum testada no vinho tinto.

Dose de Maxigum (mL/hL)	Observações	Avaliação
0	Sem formação de depósito	Estável
50	Sem formação de depósito	Estável
100	Sem formação de depósito	Estável

Com os resultados apresentados na Tabela 3.12 podemos concluir que a matéria corante está estável sem a aplicação de qualquer quantidade de Maxigum no vinho. Ainda assim, de forma a assegurar que a estabilidade do vinho se mantém ao longo do armazenamento, foi recomendada a aplicação de 50 mL/hL de Maxigum, visto que ao não se aplicar nenhuma quantidade de Maxigum a matéria corante coloidal pode-se formar durante o envelhecimento, se for sujeito a baixas temperaturas, surgindo assim o aparecimento de precipitados corantes no fundo da garrafa de vinho resultantes da instabilidade (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Ao comparar estes resultados com os resultados do laboratório externo (Anexo III), verificamos que ambos estão em concordância, visto que o controlo, ou seja o vinho tinto sem aplicação de Maxigum já se encontra estável, no entanto também é recomendada a aplicação de 50 mL/hL de Maxigum, de forma a assegurar a permanência da estabilidade da matéria corante.

Capítulo IV

4. Conclusões

Inicialmente a empresa Casa Relvas estabelecia a quantidade de clarificante, bem como a de estabilizantes tartáricos e corantes para aplicação no vinho através do aconselhamento de laboratórios externos.

Por isso, surgiu este trabalho que teve como objectivo a implementação de metodologias de análise de estabilidade dos vinhos que permitissem à Casa Relvas, obter a autonomia necessária a esta avaliação e reduzir os custos internos inerentes à subcontratação deste tipo de serviços.

Desta forma, foram estudados três tipos de instabilidades que podem surgir no vinho, tais como, a instabilidade proteica, tartárica e corante.

Para cada estabilidade foram avaliados diferentes métodos que se encontram referenciados em estudos científicos, que fossem possíveis de executar tendo em conta as necessidades produtivas, bem como reproduzíveis tendo em conta os recursos internos da organização.

Posto isto, foi definido o estudo da estabilidade proteica através de métodos como a utilização da solução de bentocheck como também o teste térmico do banho-maria a 80 °C, ambos sem e com adição de tanino.

Os resultados obtidos demonstraram que ambos os métodos permitem determinar a estabilidade dos vinhos, contudo o método implementado e que melhor se adequa a esta determinação é o teste térmico em banho-maria a 80 °C, com tanino durante 6 h, pois devido à instabilidade a que encontra sujeito o vinho, torna-o mais fiável, uma vez que garante a estabilidade sob condições críticas.

Tendo em conta o anteriormente referido, após análise da estabilidade dos vinhos em estudo, foi assim recomendada a aplicação de 60 g/hL de Pluxbenton N no vinho branco e de 40 g/hL de Pluxbenton N no vinho rosado.

Além disso, para avaliar a estabilidade tartárica foram estudados diversos métodos, como é o caso do método de permanência no frio, incluindo diversas variações em termos das condições a que o vinho está sujeito, tal como também foi avaliado o teste de mini-contacto.

Estes métodos permitiram determinar a estabilidade do vinho, em que ambos apresentaram resultados semelhantes, no entanto por ser um teste quantitativo e deste modo mais fiável, o teste de mini-contacto foi o implementado na empresa Casa Relvas.

Desta forma, ao analisar a estabilidade dos vinhos em estudo, determinou-se a aplicação de 100 mL/hL de Cellogum L no vinho branco e rosado e de 50 mL/hL de Citrogum no vinho tinto.

Por último, no estudo da estabilidade corante foi executado o método de permanência no frio durante 24 h que mostrou ser um método que permite avaliar a estabilidade da cor dos vinhos.

Ao avaliar a estabilidade corante do vinho tinto, foi recomendada a aplicação de 50 mL/hL de Maxigum no vinho tinto.

Considerando a implementação recente destes métodos para avaliar a estabilidade dos vinhos, é fundamental que durante algum tempo, os ensaios sejam acompanhados, aleatoriamente, e em paralelo com laboratórios externos, de modo a validar os resultados obtidos internamente.

Como perspectivas futuras, poderia ser enquadrado o estudo e aplicação de novos métodos de estabilização mais rápidos e que minimizem a perda de qualidade dos vinhos, como por exemplo a tecnologia de separação magnética que como já referido permite obter de forma selectiva, uma separação rápida e eficiente das proteínas causadoras de turvação nos vinhos, mas que ao contrário dos métodos utilizados atualmente, não altera a qualidade do produto final.

Referências bibliográficas

- Angele, L. (1992). STABISAT: Contrôle de la stabilité tartrique et gestion de la production. *Revue des Oenologues*, 65, 43-47.
- Artigas, J., Jiménez, C., Domínguez, C., Mínguez, S., Gonzalo, A., & Alonso, J. (2003). Development of a multiparametric analyser based on ISFET sensors applied to process control in the wine industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 89(1-2), 199-204.
- Bakalinsky, A. T., & Boulton, R. (1985). The study of an immobilized acid protease for the treatment of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 23-29.
- Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry*, 112(1), 169-177.
- Benítez, J. G., Macías, V. P., López, R. V., & Rodríguez, L. P. (2003a). Prediction of tartrate stability of sherry wines by a conductimetric system with rapid response. *Food Chemistry*, 81(3), 457-462.
- Benítez, J. G., Macías, V. P., Gorostiaga, P. S., López, R. V., & Rodríguez, L. P. (2003b). Comparison of electrodialysis and cold treatment on an industrial scale for tartrate stabilization of sherry wines. *Journal of Food Engineering*, 58(4), 373-378.
- Benítez, J. G., Macías, V. P., López, R. V., Muñoz, M. V., & Rodríguez, L. P. (2004). Characterization, control and improvement of the cold treatment of Sherry wines. *Food control*, 15(2), 111-116.
- Bosso, A., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., Asproudi, A., & Panero, L. (2016). Validation of a rapid conductimetric test for the measurement of wine tartaric stability. *Food Chemistry*, 212, 821-827.
- Bosso, A., Panero, L., Petrozziello, M., Sollazzo, M., Asproudi, A., Motta, S., & Guaita, M. (2015). Use of polyaspartate as inhibitor of tartaric precipitations in wines. *Food chemistry*, 185, 1-6.
- Boulton, R. (1980). The nature of wine proteins. In *Proceedings of the sixth annual wine industry technology seminar of the wine institute* (pp. 46-58).
- Boulton, R. (1982). La cinétique de la précipitation du bitartrate de potassium des vins. *Revue Française D'oenologie*, 87, 97-100.
- Cabello-Pasini, A., Victoria-Cota, N., Macias-Carranza, V., Hernandez-Garibay, E., & Muñoz-Salazar, R. (2005). Clarification of wines using polysaccharides extracted from seaweeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(1), 52-59.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 417-422.
- Casa Relvas (s.d. a) Vinhas: Herdade de São Miguel. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.herdadesaomiguel.com/vinhas/herdade-sao-miguel>
- Casa Relvas (s.d. b) Vinhas: Herdade da Pimenta. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.herdadesaomiguel.com/vinhas/herdade-da-pimenta>
- Casa Relvas (s.d. c) Adegas e Vinificação: Herdade da Pimenta. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.herdadesaomiguel.com/adegas/adegas-e-vinificacao/herdade-da-pimenta>
- Casa Relvas (s.d. d) Vinhas e Castas. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.herdadesaomiguel.com/vinhas/vinhas-castas>
- Casa Relvas (s.d. e) Vinhos. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.herdadesaomiguel.com/vinhos/22/126>

- Castro-Marín, A., Buglia, A. G., Riponi, C., & Chinnici, F. (2018). Volatile and fixed composition of sulphite-free white wines obtained after fermentation in the presence of chitosan. *LWT*, 93, 174-180.
- Chagas, R., Ferreira, L. M., Laia, C. A., Monteiro, S., & Ferreira, R. B. (2016). The challenging SO₂-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines. *Food Chemistry*, 192, 460-469.
- Cliff, M. A., King, M. C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40(1), 92-100.
- Crachereau, J. C., Gabas, N., Blouin, J., Hebrard, B., & Maujean, A. (2001). Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose (CMC). *Bulletin l'OIV*, 74, 151-159.
- Czibulya, Z., Horváth, I., Kollár, L., Nikfardjam, M. P., & Kunsági-Máté, S. (2015). The effect of temperature, pH, and ionic strength on color stability of red wine. *Tetrahedron*, 71(20), 3027-3031.
- De Bruijn, J., Loyola, C., Flores, A., Hevia, F., Melín, P., & Serra, I. (2009). Protein stabilisation of Chardonnay wine using trisacryl and bentonite: a comparative study. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 330-336.
- Donovan, J. L., McCauley, J. C., Nieto, N. T., & Waterhouse, A. L. (1998). Effects of Small-Scale Fining on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Merlot Wine. In *Chemistry of Wine Flavor, ACS Symposium Series*. Waterhouse, A. L. & Ebeler, S. E. (Eds) (Vol. 714, pp. 142-155). Washington, DC American Chemical Society.
- Dunsford, P., & Boulton, R. (1981). The kinetics of potassium bitartrate crystallization from table wines. I. Effect of particle size, particle surface area and agitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32(2), 100-105.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461-7466.
- Enartis (s.d.). Estabilização tartárica com Cellogum L. Consultado em Fevereiro de 2019 em: <http://www.enartis.com.pt/download/Estabiliza%C3%A7%C3%A3o%20tart%C3%A1rica%20com%20Cellogum%20L.pdf>
- Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009). Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(3), 302-311.
- Falconer, R. J., Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., & Waters, E. J. (2009). Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 975-980.
- Ferenczy, S. (1966). Etude des proteines et des substances azotees. Leur evolution au cours des traitements oenologiques. Conditions de la stabilite proteique des vins. *Bull. OIV*, 39, 1311-1336.
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12(7), 230-239.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S. S., Picarra-Pereira, M. A., & Teixeira, A. R. (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *TRENDS in Biotechnology*, 22(4), 168-173.

- Feuillat, M., Brillant, G., & Rochard, J. (1980). Mise en évidence d'une production de proteases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Connaissance Vigne Vin*, 14, 37-52.
- Francis, I. L., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1994). The Sensory Effects of Preor Post-Fermentation Thermal Processing on Chardonnay and Semillon Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 243-251.
- García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105(1), 248-259.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Blouin, J., & Crachereau, J. C. (2010). Study of wine tartaric acid salt stabilization by addition of carboxymethylcellulose (CMC): comparison with the «protective colloids» effect. *OENO One*, 44(4), 231-242.
- Girbau, T., Stummer, B. E., Pocock, K. F., Baldock, G. A., Scott, E. S., & Waters, E. J. (2004). The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 125-133.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2002). Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *LWT-Food Science and Technology*, 35(1), 46-53.
- Gonçalves, F., Fernandes, C., dos Santos, P. C., & de Pinho, M. N. (2003). Wine tartaric stabilization by electrodialysis and its assessment by the saturation temperature. *Journal of Food Engineering*, 59(2-3), 229-235.
- González-Neves, G., Favre, G., & Gil, G. (2014). Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chemistry*, 157, 385-392.
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2008). *Wine production: vine to bottle*. John Wiley & Sons. (pp. 48-60). ISBN: 978-14051-1365-6.
- Guisse, R., Filipe-Ribeiro, L., Nascimento, D., Bessa, O., Nunes, F. M., & Cosme, F. (2014). Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chemistry*, 156, 250-257.
- Ibeas, V., Correia, A. C., & Jordão, A. M. (2015). Wine tartrate stabilization by different levels of cation exchange resin treatments: impact on chemical composition, phenolic profile and organoleptic properties of red wines. *Food Research International*, 69, 364-372.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications*. Academic press. (pp. 332-642). ISBN: 978-0-12-373646-8.
- Jaeckels, N., Meier, M., Dietrich, H., Will, F., Decker, H., & Fronk, P. (2016). Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. *Food Chemistry*, 200, 38-45.
- Jaeckels, N., Tenzer, S., Meier, M., Will, F., Dietrich, H., Decker, H., & Fronk, P. (2017). Influence of bentonite fining on protein composition in wine. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 335-343.
- Jakob, L. (1962). Bentotest, eine Schnellmethode zur Ermittlung des Bentonitbedarfs bei der Bentonitschönung von Säften und Weinen. *Das Weinblatt*, 57, 805-807.
- Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19(6), 596-607.

- Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violetta, M. R., & Giuffrida, M. G. (2012). Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 460-467.
- Lasanta, C., Caro, I., & Pérez, L. (2013). The influence of cation exchange treatment on the final characteristics of red wines. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1072-1078.
- Lasanta, C., & Gómez, J. (2012). Tartrate stabilization of wines. *Trends in Food Science & Technology*, 28(1), 52-59.
- Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., Salazar, F. N., Orriols, I., Fornos, D., & López, F. (2015). Impact of bentonite additions during vinification on protein stability and volatile compounds of Albariño wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 3004-3011.
- Lona, A.. (2003). *Vinhos - Degustação, Elaboração e Serviço. 8ª Edição. Editora Age, Ltd.* (pp. 60-67). ISBN: 978-8585627041.
- Lubbers, S., Leger, B., Charpentier, C., & Feuillat, M. (1993). Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *OENO One*, 27(1), 13-22.
- Mainente, F., Zoccatelli, G., Lorenzini, M., Cecconi, D., Vincenzi, S., Rizzi, C., & Simonato, B. (2014). Red wine proteins: two dimensional (2-D) electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Food Chemistry*, 164, 413-417.
- Malacarne, M., Bergamo, L., Bertoldi, D., Nicolini, G., & Larcher, R. (2013). Use of Fourier transform infrared spectroscopy to create models forecasting the tartaric stability of wines. *Talanta*, 117, 505-510.
- Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., ... & Waters, E. J. (2012). Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chemistry*, 135(3), 1157-1165.
- Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters, E. J., & Menz, R. I. (2014). Structure of haze forming proteins in white wines: Vitis vinifera thaumatin-like proteins. *PloS one*, 9(12), e113757.
- Mariod, A. A. (2018). Enhancement of Color Stability in Foods by Gum Arabic. In *Gum Arabic Structure, Properties, Application and Economics*, Academic Press (pp. 143-150). ISBN 978-0-12-812002-6
- Marín, F. Z. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Mundi-Prensa Libros (pp.67). ISBN: 978-84-89922-88-4.
- Marquez, A., Serratos, M. P., & Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146, 507-514.
- McKinnon, A. J., Scollary, G. R., Solomon, D. H., & Williams, P. J. (1994). The mechanism of precipitation of calcium L (+)-tartrate in a model wine solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 82(3), 225-235.
- Mesquita, P. R., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 324-330.
- Mesrob, B., Gorinova, N., & Tsakov, D. (1983). Characterisation of the electrical properties and molecular weights of the proteins in white wines. *Nahrung*, 27(8), 727.
- Mierczynska-Vasilev, A., Boyer, P., Vasilev, K., & Smith, P. A. (2017). A novel technology for the rapid, selective, magnetic removal of pathogenesis-related proteins from wines. *Food Chemistry*, 232, 508-514.

- Mierczynska-Vasilev, A., Mierczynski, P., Maniukiewicz, W., Visalakshan, R. M., Vasilev, K., & Smith, P. A. (2019). Magnetic separation technology: Functional group efficiency in the removal of haze-forming proteins from wines. *Food Chemistry*, 275, 154-160.
- Moutounet, M., Saint-Pierre, B., Battle, J. L., & Escudier, J. L. (1997). Le stabilisateur tartrique: principe et description du procédé. *Revue Française D'oenologie*, (162), 15-17.
- Müller-spath, H. (1977). Un nouveau procédé de prévention des précipitations de bitartrate de potassium: le procédé contact. *Annales de Technologies Agricole*, 27(1), 333-334.
- OIV Code Sheet –Issue 2015/01. Wines. International Code of Oenological Practices. Consultado em Janeiro de 2019 em: <http://www.oiv.int/public/medias/3921/e-code-i-31.pdf>
- Pashova, V., Güell, C., & López, F. (2004). White wine continuous protein stabilization by packed column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1558-1563.
- Pérez-Lamela, C., García-Falcón, M. S., Simal-Gándara, J., & Orriols-Fernández, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, 101(2), 601-606.
- Pocock, K. F., & Rankine, B. C. (1973). Heat test for detecting protein instability in wine. *Australian Wine Brewing Spirit Review*, 91(5), 42-43.
- Pocock, K. F., Høj, P. B., Adams, K. S., Kwiatkowski, M. J., & Waters, E. J. (2003). Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 56-63.
- Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry*. M. V. Moreno-Arribas M. V. & Polo M.C. (Eds.). (pp. 3-28). New York: Springer. ISBN: 978-0-387-74116-1
- Ratsimba, B., Laguerie, C., Biscans, B., & Gaillard, M. (1989). Solubilité du bitartrate de potassium dans les solutions hydroalcooliques: influence de paramètres spécifiques al'oenologie. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 3, 325-330.
- Reg. (CE) n.º 606/2009 de 10 de Julho, que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis, Jornal Oficial da União Europeia n.º. L 193/1. Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas.
- Reg. (CE) n.º. 491/2009 de 25 de Maio, que altera o Regulamento (CE) n.º 1234/2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas, Jornal Oficial da União Europeia n.º. L 154/1. Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas.
- Reg. (CE) n.º. 607/2009 de 14 de Julho, que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às denominações de origem protegidas e indicações geográficas protegidas, às menções tradicionais, à rotulagem e à apresentação de determinados produtos vitivinícolas, Jornal Oficial da União Europeia n.º. L 193/60. Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas.
- Revilla, I., & González-San José, M. L. (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(1), 29-36.
- Ribereau-Gayon, P. (1977). *Sciences et techniques du vin: Clarification et stabilisation, matériels et installations* (pp. 255-258). Dunod. ISBN: 9782040051822
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (Eds.). (2006). *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments, 2ª Edição*. John Wiley & Sons. (pp. 10-302) Chichester. ISBN-13: 978-0-470-01037-2.

- Rivero, F. J., Jara-Palacios, M. J., Gordillo, B., Heredia, F. J., & González-Miret, M. L. (2019). Impact of a post-fermentative maceration with overripe seeds on the color stability of red wines. *Food Chemistry*, 272, 329-336.
- Salazar, F. N., Achaerandio, I., Labb, M. A., Gell, C., & Lopez, F. (2006). Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9955-9958.
- Salgues, M., Heitz, F., & Bidan, P. (1982). Reflexions sur la cristallisation du tarte dans les vins. *Bulletin de l'OIV-Office international de la vigne et du vin*, 55, 229-238.
- Santos, P. C. D., Pereira, O. M., Gonçalves, F., Simões, J. T., & De Pinho, M. N. (2000). Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: Estudo comparativo da electrodiálise e de um método tradicional. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 15(2), 95-108.
- Sarmiento, M. R., Oliveira, J. C., Slatner, M., & Boulton, R. B. (2000a). Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control*, 11(6), 423-432.
- Sarmiento, M. R., Oliveira, J. C., & Boulton, R. B. (2000b). Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 41-47.
- Sauvage, F. X., Bach, B., Moutounet, M., & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118(1), 26-34.
- Saywell, L. G. (1934). Clarification of wine. *Industrial & Engineering Chemistry*, 26(9), 981-982.
- Tian, B., Harrison, R., Morton, J., & Jaspers, M. (2019). Changes in pathogenesis-related proteins and phenolics in *Vitis vinifera* L. cv. 'Sauvignon Blanc' grape skin and pulp during ripening. *Scientia Horticulturae*, 243, 78-83.
- Valsechi, O. (2008) *A História de Vinho*. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, p.1 – 40.
- Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Marangon, M. (2015). Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4020-4030.
- Vecchio, R., Decordi, G., Grésillon, L., Gugenberger, C., Mahéo, M., & Jourjon, F. (2017). European consumers' perception of moderate wine consumption on health. *Wine Economics and Policy*, 6(1), 14-22.
- Vincenzi, S., Polesani, M., & Curioni, A. (2005). Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 246-254.
- Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'NEILL, B. K., Høj, P.B. & Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 215-225.
- Wines of Portugal - Casa Agrícola Alexandre Relvas. Consultado em Março de 2019 em: <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=132991>
- Zoecklein, B. (1988). *Bentonite fining of juice and wine*. Virginia Cooperative Extension Service. Nº 463-014.
- Zoecklein, B. (1990). A review of potassium bitartrate stabilization of wines. *Publication-Virginia Cooperative Extension Service (USA)*. ISSN : 0093-2809.
- Zoecklein, B. (1991). Protein stability determination in juice and wine. Virginia Cooperative Extension Service. Nº 463-015.

Anexos

Anexo I

Tabela A.1: Relatório das estabilidades proteica e tartárica do vinho branco e rosado, obtido pelo laboratório externo.

PARÂMETROS ANALÍTICOS										
Esp.	Descrição do Ensaio	Estab. Proteica (NTU)								Estab. Tartárica (µS)
		Testemunha sem tanino				Testemunha com tanino				
		30 min	2h	4h	6h	30 min	2h	4h	6h	
vb	Test + 0g/hL PluxBenton N	Estável (0,38)	Estável (1,25)	Instável (3,38)	Instável (4,12)	Instável (78,31)	Instável (78,95)	Instável (100,09)	Instável (112,87)	
vb	Test + 40g/hL PluxBenton N	Estável (0,09)	Estável (0,24)	Estável (0,53)	Estável (1,30)	Estável (1,48)	Estável (4,61)	Estável (4,77)	Instável (13,73)	
vb	Test + 60g/hL PluxBenton N	Estável (0,06)	Estável (0,21)	Estável (0,45)	Estável (1,25)	Estável (0,24)	Estável (1,12)	Estável (4,57)	Estável (7,23)	
vb	Test + 80g/hL PluxBenton N	Estável (0,05)	Estável (0,14)	Estável (0,25)	Estável (1,21)	Estável (0,07)	Estável (0,50)	Estável (0,62)	Estável (6,39)	
vb	Test + 0 ml/hL Cellogum L									Instável (197)
vb	Test + 100 ml/hL Cellogum L									Estável (31)
vb	Test + 150 ml/hL Cellogum L									Estável (31)
vb	Test + 200 ml/hL Cellogum L									Estável (31)
vr	Test + 0g/hL PluxBenton N	Estável (0,09)	Estável (0,09)	Estável (0,19)	Estável (1,42)	Estável (1,24)	Estável (1,87)	Estável (8,27)	Instável (11,24)	
vr	Test + 40g/hL PluxBenton N	Estável (0,08)	Estável (0,08)	Estável (0,16)	Estável (0,44)	Estável (0,52)	Estável (1,10)	Estável (1,21)	Estável (3,60)	
vr	Test + 60g/hL PluxBenton N	Estável (0,07)	Estável (0,08)	Estável (0,13)	Estável (0,43)	Estável (0,31)	Estável (0,51)	Estável (1,00)	Estável (3,33)	
vr	Test + 80g/hL PluxBenton N	Estável (0,03)	Estável (0,04)	Estável (0,06)	Estável (0,07)	Estável (0,03)	Estável (0,08)	Estável (0,57)	Estável (0,95)	
vr	Test + 0 ml/hL Cellogum L									Instável (193)
vr	Test + 100 ml/hL Cellogum L									Muito Estável (36)
vr	Test + 150 ml/hL Cellogum L									Muito Estável (36)
vr	Test + 200 ml/hL Cellogum L									Muito Estável (37)

Interpretação dos resultados estabilidade tartárica:

Vinho Branco:

Muito Estável	<30
Estável	30-50
Em risco	50-70
Instável	>70

Vinho Tinto e Rosado:

Muito Estável	<40
Estável	40-60
Em risco	60-80
Instável	>80

Interpretação dos resultados estabilidade proteica

Vinho branco, rosado e tinto:

Testemunha		Testemunha com tanino	
Estável	<2	Estável	<10
Instável	>2	Instável	>10

Anexo II

Tabela A.2: Relatório da estabilidade tartárica do vinho tinto, obtido pelo laboratório externo.

PARÂMETROS ANALÍTICOS							
Data	Esp.	Vasilha	Ensaio	Descrição do Ensaio	Estab. Proteica (NTU)	Estab. Tartárica (µS)	Estabilidade Corante (% v/v)
18/05/2018	vt			Test + 0 ml/hL Citrogum		Instável (87)	
18/05/2018	vt			Test + 50 ml/hL Citrogum		Estável (44)	
18/05/2018	vt			Test + 100 ml/hL Citrogum		Estável (45)	
18/05/2018	vt			Test + 150 ml/hL Citrogum		Estável (52)	
18/05/2018	vt			Test + 200 ml/hL Citrogum		Estável (48)	

Interpretação dos resultados estabilidade tartárica:

Vinho Branco:

Muito Estável	<30
Estável	30-50
Em risco	50-70
Instável	>70

Vinho Tinto e Rosado:

Muito Estável	<40
Estável	40-60
Em risco	60-80
Instável	>80

**Interpretação dos resultados estabilidade proteica
Vinho branco, rosado e tinto:**

Testemunha	
Estável	<2
Instável	>2

Testemunha com tanino	
Estável	<10
Instável	>10

Anexo III

Tabela A.3: Relatório da estabilidade corante do vinho tinto, obtido pelo laboratório externo.

ESTABILIDADE CORANTE			
Amostra	Ensaio com Maxigum		Dose recomendada de Maxigum
VT2017	Controlo	Estável s/ depósito	50 mL/hL
	50 mL/hL	n.d.	
	100 mL/hL	n.d.	

n.d. – não determinado

Anexo IV

Tabela A.4: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck sem adição de tanino no vinho branco.

Dose Pluxbenton N (g/hL)				
	0 g/hL	40 g/hL	60 g/hL	80 g/hL
Δ Turbidez (NTU)	60,93	16,85	17,50	47,53
	68,35	17,19	15,02	59,83
	69,32	1,68	0,28	0,26
	66,27	1,78	0,49	0,49
	62,97	1,56	0,38	0,10
	63,81	1,66	0,55	0,07
	67,87	1,58	0,20	0,31
	65,26	1,62	0,44	0,15
	70,06	0,32	0,48	0,31
	68,05	0,12	0,59	0,26
	71,43	0,21	0,46	0,24
	69,37	0,22	0,45	0,52
	68,33	0,41	0,46	0,76
	70,31	0,26	0,49	0,19
	48,58	0,97	0,21	0,29
	48,64	1,54	0,08	0,19
	50,12	0,98	0,22	0,33
	47,23	0,79	0,24	0,30
	48,81	0,99	0,25	0,21
	49,56	1,10	0,37	0,43

Tabela A.5: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck com adição de tanino no vinho branco.

Dose Pluxbenton N (g/hL)				
	0 g/hL	40 g/hL	60 g/hL	80 g/hL
Δ Turbidez (NTU)	81,40	26,74	24,46	60,10
	85,90	23,68	23,92	49,20
	78,50	9,74	0,56	0,65
	78,70	2,28	1,04	0,81
	89,00	1,83	0,79	0,55
	84,10	1,53	1,08	0,40
	76,50	1,70	0,55	0,00
	94,30	1,71	1,01	0,74
	83,30	1,66	0,88	0,35
	85,10	0,42	0,61	0,37
	83,50	0,41	1,00	0,32
	87,00	0,42	0,70	0,50
	85,70	0,70	0,67	0,36
	81,90	0,40	0,81	0,42
	55,30	0,57	0,37	1,93
	55,10	0,96	0,27	0,45
	50,70	0,97	0,33	0,61
	48,20	0,87	0,62	0,15
	50,80	0,99	0,47	0,29
	50,70	0,93	0,68	-
-	0,67	-	-	

Tabela A.6: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho branco nas doses de 0 e 40 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	0 g/hL				40 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,00	0,00	0,36	2,63	0,08	0,21	0,49	0,67
	0,12	0,00	0,70	5,02	0,04	0,25	0,36	0,92
	3,75	0,43	1,09	5,40	0,16	0,12	0,24	0,48
	0,04	0,15	0,27	0,97	0,27	0,12	0,21	0,32
	0,89	0,19	0,31	0,63	0,48	0,23	0,28	0,46
	0,08	0,39	1,14	7,12	0,10	0,20	0,30	0,63
	0,78	0,34	0,57	3,19	0,23	0,09	0,17	0,52
	1,01	0,36	1,10	2,92	0,26	0,13	0,23	0,35
	0,23	1,19	0,95	3,96	0,00	0,08	0,09	0,21
	0,15	0,25	0,51	1,97	0,00	0,05	0,14	0,58
	0,17	0,29	0,48	1,71	0,74	0,61	0,92	1,07
	-	-	-	-	0,22	0,09	0,21	0,31
	-	-	-	-	0,04	0,00	0,05	0,19
	-	-	-	-	0,00	0,04	0,12	0,24

Tabela A.7: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho branco nas doses de 60 e 80 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	60 g/hL				80 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,48	0,00	0,21	0,44	0,00	0,00	0,00	0,05
	0,00	0,00	0,07	0,28	0,12	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,10	0,12	0,60	0,05	0,35	0,54	0,40
	0,13	0,31	0,12	0,17	0,03	0,19	0,28	0,45
	0,15	0,31	0,18	0,42	0,11	0,27	0,18	0,35
	0,36	0,52	0,52	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,29	0,25	0,60	1,41	0,05	0,06	0,29	0,34
	0,34	0,39	0,62	0,93	0,25	0,17	0,32	0,64
	0,17	0,21	0,32	0,27	0,03	0,01	0,40	0,38
	0,00	0,33	0,20	0,34	0,25	0,27	0,19	0,37
	0,23	0,11	0,50	0,61	0,15	0,09	0,19	0,45

Tabela A.8: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho branco nas doses de 0 e 40 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	0 g/hL				40 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	37,10	66,50	90,40	123,40	18,04	40,44	55,64	73,54
	36,40	58,30	82,90	124,90	20,78	35,68	48,58	65,58
	47,20	58,90	84,10	99,10	0,60	7,58	14,14	17,24
	38,00	42,10	44,70	41,30	1,00	9,16	15,46	19,36
	47,90	60,00	83,00	99,00	1,06	4,82	10,94	12,64
	51,70	76,50	89,30	117,30	0,15	3,53	6,27	11,68
	55,80	76,90	93,70	123,70	0,29	3,66	6,90	11,86
	56,00	76,80	95,50	121,50	0,46	2,55	4,25	9,95
	71,65	87,75	103,05	118,05	0,07	0,69	1,09	1,98
	75,87	89,67	107,07	121,07	0,54	0,54	1,50	2,37
	73,90	88,50	102,60	117,60	0,02	0,65	1,29	2,27
	-	-	-	-	1,41	1,45	9,81	11,31
	-	-	-	-	1,05	1,76	13,77	17,77
-	-	-	-	1,00	1,06	7,74	9,62	

Tabela A.9: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho branco nas doses de 60 e 80 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	60 g/hL				80 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	16,56	35,86	47,56	70,46	25,70	26,40	49,80	68,70
	14,42	31,92	43,62	58,22	39,20	31,50	36,30	37,90
	0,00	0,27	2,51	3,58	0,00	0,00	0,00	0,29
	0,00	0,00	0,35	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,49	2,75	4,24	0,00	0,00	0,86	2,09
	0,00	0,28	0,37	2,35	0,00	0,00	0,18	0,62
	0,00	0,39	0,64	1,65	0,00	0,00	0,75	1,04
	0,00	0,42	0,69	1,63	0,00	0,08	0,47	0,84
	0,43	1,13	2,42	5,97	0,00	0,23	1,10	2,73
	0,00	0,49	2,11	4,54	0,11	0,18	1,06	3,06
	0,32	1,43	3,55	6,85	0,10	0,73	1,07	2,44

Tabela A.10: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck sem adição de tanino no vinho rosado.

Dose Pluxbenton N (g/hL)				
	0 g/hL	40 g/hL	60 g/hL	80 g/hL
Δ Turbidez (NTU)	0,11	0,15	0,21	0,37
	0,13	0,27	0,27	0,41
	0,11	0,04	0,07	0,21
	0,18	0,24	0,09	0,10
	0,50	0,06	0,08	0,02
	0,37	0,12	0,09	0,15
	0,11	0,13	0,06	0,12
	0,20	0,11	0,09	0,09
	0,22	0,14	0,10	0,13
	0,16	0,36	0,14	0,10
	0,19	0,12	0,09	0,08
	0,08	0,09	0,09	0,11
	0,16	0,11	0,09	0,15
	0,31	0,15	0,15	0,13
	0,17	0,14	0,18	1,02
	0,25	0,38	0,25	0,23
	0,24	0,12	0,29	0,15
	0,33	0,21	0,13	0,38
	0,37	0,13	0,13	0,28
	0,25	0,12	0,26	0,15
	0,19	-	-	-
	0,29	-	-	-
	0,29	-	-	-
	0,20	-	-	-
	0,81	-	-	-
	0,95	-	-	-
0,15	-	-	-	
1,01	-	-	-	
0,46	-	-	-	
0,19	-	-	-	

Tabela A.11: Valores obtidos de variação da turvação, no método bentocheck com adição de tanino no vinho rosado.

Dose Pluxbenton N (g/hL)				
	0 g/hL	40 g/hL	60 g/hL	80 g/hL
Δ Turbidez (NTU)	0,22	0,17	0,20	0,40
	0,07	0,06	0,23	0,17
	0,13	0,30	0,10	0,19
	0,73	0,05	0,16	0,26
	0,39	0,09	0,00	0,34
	0,07	0,17	0,07	0,09
	0,18	0,08	0,08	0,04
	0,13	0,14	0,09	0,18
	0,19	0,09	0,03	0,09
	0,12	0,07	0,04	0,14
	0,22	0,11	0,06	0,17
	0,24	0,08	0,01	0,14
	0,46	0,03	0,00	0,09
	0,39	0,14	0,19	0,02
	0,16	0,20	0,21	0,38
	0,13	0,15	0,30	0,13
	0,39	0,04	0,14	0,20
	0,08	0,10	0,40	0,23
	0,19	0,08	0,11	0,14
	0,20	0,11	0,15	0,18
	0,13	-	-	-
	0,19	-	-	-
	0,19	-	-	-
	0,04	-	-	-
	0,26	-	-	-
0,10	-	-	-	
0,04	-	-	-	
0,14	-	-	-	

Tabela A.12: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho rosado nas doses de 0 e 40 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	0 g/hL				40 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,18	0,03	0,03	-	0,00	0,02	0,17	0,08
	1,05	0,05	0,12	0,51	0,00	0,25	0,17	0,17
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,05	0,21	0,12
	0,00	0,00	0,07	0,00	0,06	0,08	0,13	0,08
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,06	0,22	0,21
	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,05	0,02
	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00	0,00	0,06	0,00
	0,00	0,09	0,00	0,18	0,04	0,00	0,34	0,16
	0,06	0,16	0,00	0,00	0,13	0,21	0,09	0,07
	0,00	0,00	0,18	0,10	0,22	0,13	0,17	0,10
	0,02	0,05	0,09	0,10	-	-	-	-
	0,00	0,02	0,04	0,10	-	-	-	-
	0,05	0,00	0,05	0,05	-	-	-	-
	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	
0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	

Tabela A.13: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C sem adição de tanino no vinho rosado nas doses de 60 e 80 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	60 g/hL				80 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,00	0,03	0,34	0,14	0,03	0,02	0,17	0,02
	0,00	0,05	0,20	0,74	0,00	0,00	0,18	0,05
	0,06	0,09	0,52	0,24	0,01	0,00	0,00	0,01
	0,05	0,00	0,50	0,28	0,18	0,10	0,11	0,00
	0,04	0,10	0,27	0,10	0,03	0,13	0,00	0,03
	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,07
	0,02	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,22
	0,03	0,04	0,10	0,18	0,01	0,00	0,00	0,00
	0,08	0,19	0,27	0,17	0,15	0,00	0,34	0,14
	0,08	0,06	0,54	0,38	0,00	0,00	0,16	-
	0,09	0,00	0,35	0,31	0,00	0,00	0,30	-

Tabela A.14: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho rosado nas doses de 0 e 40 g/hL

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	0 g/hL				40 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,00	0,41	1,87	4,14	0,00	0,00	0,77	2,43
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,96
	0,00	0,13	0,23	3,03	0,00	0,00	0,22	0,17
	0,00	0,16	0,22	0,20	0,00	0,00	0,06	0,01
	0,02	0,13	0,35	3,55	0,00	0,00	0,00	0,55
	0,03	0,10	0,18	0,64	0,01	0,06	0,09	0,17
	0,00	0,08	0,17	0,33	0,00	0,05	0,12	0,19
	0,05	0,09	0,15	0,30	0,03	0,02	0,12	0,12
	0,16	0,31	4,21	2,64	0,00	0,03	0,18	0,47
	0,23	0,31	4,99	3,05	0,13	0,00	0,22	0,43
	0,21	0,32	4,99	4,79	0,01	0,20	0,27	1,36
	0,13	0,21	3,27	0,56	-	-	-	-
	0,10	0,16	2,64	0,82	-	-	-	-
	0,17	0,35	3,34	1,33	-	-	-	-
	0,05	0,22	0,32	-	-	-	-	-
0,07	0,25	0,31	-	-	-	-	-	
0,06	0,16	0,29	-	-	-	-	-	

Tabela A.15: Valores obtidos de variação da turvação, no método banho-maria a 80 °C com adição de tanino no vinho rosado nas doses de 60 e 80 g/hL.

Dose Pluxbenton N (g/hL)								
	60 g/hL				80 g/hL			
	30 min	2 h	4 h	6 h	30 min	2 h	4 h	6 h
Δ Turbidez (NTU)	0,00	0,00	3,52	-	0,00	0,00	0,00	-
	0,00	0,00	0,29	0,29	0,00	0,00	0,45	0,77
	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,59	0,59
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,26	0,33
	0,04	0,04	0,21	0,53	0,04	0,15	0,16	0,31
	0,07	0,06	0,22	0,41	0,11	0,13	0,18	0,26
	0,06	0,15	0,33	0,42	0,11	0,12	0,17	0,28
	0,15	0,03	1,37	3,85	0,14	0,31	0,61	1,93
	0,17	0,24	1,32	3,13	0,19	0,09	0,61	2,11
	0,07	0,17	1,55	3,68	0,06	0,12	0,63	1,94

Tabela A.16: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho branco nas doses de Cellogum L testadas.

Dose Cellogum L (mL/hL)				
	0 mL/hL	100 mL/hL	150 mL/hL	200 mL/hL
Δ Condutividade (μS)	157	32	58	80
	157	10	10	17
	150	12	15	13
	125	14	27	17
	159	21	25	13
	192	22	28	20
	205	25	25	17
	187	16	16	21
	208	18	23	23
	-	30	25	10
	-	-	-	19
	-	-	-	16

Tabela A.17: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho rosado nas doses de Cellogum L testadas.

Dose Cellogum L (mL/hL)				
	0 mL/hL	100 mL/hL	150 mL/hL	200 mL/hL
Δ Condutividade (μS)	141	36	26	1
	148	31	23	1
	190	23	24	13
	190	15	17	25
	199	20	7	17
	157	25	26	16
	154	29	42	29
	156	8	30	26
	207	23	22	19
	213	14	17	13
	-	-	21	17

Tabela A.18: Valores obtidos de variação da condutividade no vinho tinto nas doses de Citrogum testadas.

	Dose Cellogum L (mL/hL)				
	0 mL/hL	50 mL/hL	100 mL/hL	150 mL/hL	200 mL/hL
Δ Condutividade (μS)	47	29	28	25	12
	66	19	9	24	21
	40	22	14	5	17
	52	10	14	17	17
	80	13	14	17	14
	73	34	37	16	6
	32	38	52	29	25
	72	35	31	33	29
	69	26	23	32	26
	61	30	13	-	35
	-	-	-	-	15

