

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Estudo comparativo de técnicas de estabilização tartárica
em vinhos: estabilização pelo frio e utilização de aditivos
enológicos**

2º Ciclo em Enologia e Viticultura

Rui Jorge Araújo Oliveira

Orientadores: Professora Doutora Fernanda Cosme

Professor Doutor Fernando M. Nunes



Vila Real, 2018

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Estudo comparativo de técnicas de estabilização tartárica
em vinhos: estabilização pelo frio e utilização de aditivos
enológicos**

2º Ciclo em Enologia e Viticultura

Rui Jorge Araújo Oliveira

Orientadores: Professora Doutora Fernanda Cosme

Professor Doutor Fernando M. Nunes

Composição do Júri:

Professor Doutor Carlos Ribeiro

Professor Doutor António M. Jordão

Professora Doutora Fernanda Cosme

Vila Real, 2018

Instituição Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Curso Mestrado em Enologia e Viticultura

Título Estudo comparativo de técnicas de estabilização tartárica em vinhos:
estabilização pelo frio e utilização de aditivos enológicos

Autor Rui Jorge Araújo Oliveira

Orientadores Professora Doutora Fernanda Cosme

Professor Doutor Fernando M. Nunes

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção de grau de Mestre em Enologia e Viticultura

“As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor”

RESUMO

A principal causa do aparecimento de precipitações em garrafa é a formação de cristais de bitartarato de potássio, nesse sentido, antes do engarrafamento, os vinhos são submetidos a um processo de estabilização tartárica. O método de estabilização mais antigo é a estabilização por frio, que provoca uma precipitação dos cristais de bitartarato de potássio pela diminuição da sua solubilidade a baixas temperaturas, sendo assim retirado do vinho o excesso de iões que causam instabilidade. É aceite, de uma maneira geral, na comunidade enológica que a estabilização pelo frio causa uma diminuição da qualidade sensorial dos vinhos. Outro método de estabilização é a aplicação de aditivos enológicos com efeito colóide protetor que impedem a formação dos cristais de bitartarato de potássio sendo os aditivos usados com mais sucesso a carboximetilcelulose (CMC) e o ácido metatartárico. Ambos têm a desvantagem de serem produtos semissintéticos e o ácido metatartárico degrada-se ao longo do tempo perdendo o seu efeito de estabilização. Devido à falta de estudos sobre o assunto o primeiro objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos na composição química e nas propriedades sensoriais do tratamento pelo frio no vinho com os efeitos provocados pelos aditivos enológicos. Foram usados três vinhos diferentes, um branco, um rosado e um tinto. O segundo objetivo deste trabalho foi fazer uma prospeção de aditivos enológicos alternativos de origem natural, algo muito valorizado pelo consumidor nos dias de hoje. Foi estudada a capacidade de estabilização tartárica de doze polissacarídeos diferentes sendo que apenas um, o ácido algínico, que revelou alguma capacidade estabilizante, ainda assim conferindo um grau de estabilização tartárica menor que o CMC e o ácido metatartárico. Verificou-se que o tratamento pelo frio teve um ligeiro impacto negativo no aroma do vinho provocando uma diminuição significativa em alguns compostos aromáticos. Provocou também uma diminuição significativa na intensidade corante dos vinhos rosado e tinto através da diminuição significativa da concentração de grande parte das antocianinas monoméricas quantificadas nos mesmos vinhos, diminuição essa que foi confirmada pelo painel de provadores no caso do vinho rosado. Observou-se que nenhum dos aditivos estudados (CMC, ácido metatartárico e ácido algínico) teve algum impacto estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quer na composição química e nas propriedades sensoriais dos vinhos, ainda que alguns resultados sugiram a existência de interações entre o ácido algínico e as antocianinas. O ácido algínico apresenta alguma potencialidade como aditivo enológico para a estabilização tartárica uma vez que não causa modificações significativas no vinho e trata-se de um composto de origem natural.

Palavras-chave: Vinho, estabilidade tartárica, estabilização por frio, carboximetilcelulose, ácido metatartárico e ácido algínico.

ABSTRACT

The main cause of sediment in bottled wine is the precipitation of tartrate crystals. In order to prevent their occurrence, before bottling, the wines are submitted to a stabilization process. The most used stabilization method is cold stabilization, which causes a precipitation of the tartrate crystals that are withdrawn, so that the excess ions that cause instability are removed from the wine. It is accepted, in a general way, in the oenological community that the cold stabilization process reduces the wine sensory quality. Another method used for wine tartaric stabilization is the application of oenological additives with colloid protective effect that prevent the formation of tartrate crystals being the most successfully used carboxymethylcellulose (CMC) and metatartaric acid. Both have the disadvantage of being semi-synthetic products and metatartaric acid degrades over time losing its effect. Due to the lack of studies the first objective of this work was to compare the effects of the cold stabilization treatment and the use of oenological stabilizers on the chemical and sensory characteristics of the wine. Three different wines were used, one white, one rosé and one red. The second objective of this work was to prospect for alternative oenological stabilizers of natural origin, something highly valued by the consumer today. The capacity of tartaric stabilization of twelve different polysaccharides was studied and only one, alginic acid, showed some stabilizing capacity, yet conferring a degree of tartaric stabilization lower than CMC and metatartaric acid. Cold treatment has been found to have a slight negative impact on wine aroma causing a significant decrease in some aromatic compounds. It also caused a significant decrease in the color intensity of rosé and red wines by a significant decrease in the concentration of the monomeric anthocyanins quantified in the same wines, a decrease that was confirmed by the sensory panel in the case of rosé wine. It was observed that none of the additives studied (CMC, metatartaric acid and alginic acid) had any statistically significant impact ($p < 0.05$) either on the chemical composition and on the sensory properties of the wines studied, although some results suggest the existence of interactions between the alginic acid and anthocyanins. Alginic acid has some potential as an oenological stabilizer for tartaric stabilization since it does not cause significant changes in wine and is a polysaccharide of natural origin.

Keywords: Wine, tartaric stability, cold stabilization, carboxymethylcellulose, metatartaric acid and alginic acid.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE QUADROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS	XII
AGRADECIMENTOS	XIV
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS ORGÂNICOS DO VINHO	1
1.2. COMPOSIÇÃO MINERAL DO VINHO	2
1.3. ESTABILIDADE TARTÁRICA	2
1.3.1 Processo de cristalização	4
1.3.2 Fatores condicionantes da cristalização	5
1.3.3 Determinação da estabilidade tartárica	8
1.4 MÉTODOS DE ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA	11
1.4.1 Estabilização por frio	11
1.4.1.1 Estabilização espontânea	12
1.4.1.2 Estabilização descontínua	12
1.4.1.3 Estabilização contínua	13
1.4.2 Estabilização por aditivos enológicos	14
1.4.2.1 Carboximetilcelulose	14
1.4.2.1 Manoproteínas	16
1.4.2.3 Ácido metatartárico	17
1.4.2.4 Goma arábica	18
1.4.3 Estabilização por eletrodialise	18
1.4.4 Estabilização por resinas de troca iónica	20
1.4.5 Custos e impactos ambientais dos métodos de estabilização tartárica	21
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23

3.1 Características dos vinhos	23
3.2 <i>Screening</i> de alternativas naturais à CMC	23
3.3 Ensaio de estabilização	24
3.4 Teste de minicontacto	24
3.5 Quantificação de catiões	24
3.6 Ácido tartárico	24
3.7 Compostos fenólicos totais, flavonoides e não flavonoides	25
3.8 Potencial de acastanhamento	25
3.9 Pigmentos totais, pigmentos poliméricos, antocianinas totais e antocianinas coradas	25
3.10 Cor e tonalidade corante	26
3.11 Caracterização cromática	26
3.12 Quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas monoméricas por HPLC	27
3.13 Análise do perfil aromático por GC-MS	27
3.14 Análise sensorial	28
3.15 Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 <i>Screening</i> de alternativas naturais à CMC	29
4.2 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica, ácido tartárico e catiões dos vinhos	30
4.3 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição fenólica, características cromáticas e potencial de acastanhamento dos vinhos	34
4.4 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição fenólica – Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides dos vinhos	41
4.5 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição do perfil de aromas dos vinhos - Identificação e quantificação de compostos de aroma	49
4.6 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos vinhos	54
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do ácido tartárico.	1
Figura 2 - Estrutura dos sais do ácido tartárico.	3
Figura 3 - Distribuição das frações ionizadas do ácido tartárico em função do pH.	6
Figura 4- Determinação experimental da temperatura de saturação.	9
Figura 5 – Estrutura química da carboximetilcelulose.	15
Figura 6 – Estrutura química do ácido metatartárico.	17
Figura 7 – Esquema de funcionamento de uma unidade de eletrodialise.	19
Figura 8 – Estrutura química do ácido algínico.	30
Figura 9 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	31
Figura 10 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	32
Figura 11 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração em flavonoides em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	34
Figura 12 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração em antocianinas coradas e pigmentos poliméricos em dois vinhos, um rosado e um tinto.	35
Figura 13 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na intensidade corante de um vinho tinto.	38
Figura 14 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de catequina em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	42
Figura 15 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração total em antocianinas de um vinho tinto.	44
Figura 16 – Cromatogramas a 280nm relativos ao vinho tinto testemunha e ao vinho tinto tratado por frio, obtidos por HPLC-DAD.	45

Figura 17 – Cromatogramas a 325nm relativos ao vinho tinto testemunha e ao vinho tinto tratado por frio, obtidos por HPLC-DAD	45
Figura 18 – Cromatogramas a 525nm relativos ao vinho tinto testemunha e ao vinho tinto tratado por frio, obtidos por HPLC-DAD	46
Figura 19 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de 2-feniletanol em dois vinhos, um branco e um rosado.	50
Figura 20 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de caproato de etilo num vinho branco.	50
Figura 21 – Cromatogramas obtidos por cromatografia de fase gasosa do vinho branco testemunha e ao vinho branco tratado pelo frio.	51
Figura 22 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho branco.	55
Figura 23 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho rosado.	55
Figura 24 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho tinto.	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Duração do efeito protetor do ácido metatartárico <i>versus</i> temperatura de conservação do vinho.	18
Quadro 2 - Custos dos diferentes métodos de estabilização tartárica.	21
Quadro 3 - Características físico-químicas dos vinhos estudados.	23
Quadro 4 - Efeito dos diferentes polissacarídeos na estabilidade tartárica de um vinho branco.	29
Quadro 5 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica, concentração de ácido tartárico e catiões em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	33
Quadro 6 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na cor e no potencial de acastanhamento no vinho branco.	36
Quadro 7 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição fenólica e potencial de acastanhamento em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	39
Quadro 8 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização nas características cromáticas em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	40
Quadro 9 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de catequina e de ácidos fenólicos (em mg/L) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	47
Quadros 10.1 e 10.2 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de antocianinas monoméricas e antocianinas totais (em mg/L) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	48
Quadro 11.1 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de compostos aromáticos (expressos pela área dos picos cromatográficos) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	52
Quadro 11.2 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de compostos aromáticos (expressos pela área dos picos cromatográficos) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	53
Quadro 12 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos visuais de três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	56
Quadro 13 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos de aroma de três vinhos, um branco um rosado e um tinto.	57

Quadro 14 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos de boca de três vinhos, um branco um rosado e um tinto. 58

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

ΔE^* - Diferença total de cor entre o vinho tratado e a testemunha

$(\Delta L)_x$ °C - Diferença de condutividade elétrica sem e com a adição de KHT à temperatura de x °C.

Δx - variação da condutividade elétrica

a^* - Coordenada vermelho

A_x – Absorvância a x nanómetros de comprimento de onda

b^* - Coordenada amarelo

C – Concentração real de bitartarato no vinho

C^* - Saturação cromática

CMC – Carboximetilcelulose

CS – Concentração de saturação

Cya-3-AcGlc - Cianidina-3-acetilglicosídeo

Cya-3-CoGlc - Cianidina-3-coumaroilglicosídeo

Cya-3-Glc - Cianidina-3-glicosídeo

Del-3-AcGlc - Delphinidina-3-acetilglicosídeo

Del-3-CoGlc - Delphinidina-3-coumarilglicosídeo

Del-3-Glc - Delphinidina-3-glicosídeo

DS - domínio de sobressaturação

GC - cromatografia de fase gasosa

GP - Grau de polimerização

GRP - ácido 2-S-glutathionilcafetarico

GS - Grau de substituição

h° - Ângulo-tom

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IPT - índice de polifenóis totais

L^* - Luminosidade

Mal-3-AcGlc - Malvidina-3-acetilglicosídeo

Mal-3-CoGlc - Malvidina-3-coumarilglicosídeo

Mal-3Glc - Malvidina-3-glicosídeo

MS – Espectrómetro de massa

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

Peo-3-AcGlc - Peonidina-3-acetilglicosídeo

Peo-3-CoGlc - Peonidina-3-coumarilglicosídeo

Peo-3-Glc - Peonidina-3-glicosídeo

Pet-3-AcGlc - Petunidina-3-acetylglucosídeo

Pet-3-CoGlc - Petunidina-3-coumarilglicosídeo

Pet-3-Glc - Petunidina-3- glicosídeo

pKa - Constante de dissociação

Ps - Produto de solubilidade

S – Superfície de adsorção

SPME - micro extração em fase-sólida

T - Tartarato

TAV – Título alcoométrico volúmico

TCC - Temperatura crítica de cristalização

Test - Temperatura de estabilidade tartárica do vinho

TCa - Tartarato neutro de cálcio

THK - Hidrogenotartarato de potássio

u.a. – Unidades de absorvância

Ts - Temperatura de saturação

V – Velocidade de cristalização

AGRADECIMENTOS

Terminado este trabalho deixo um sincero obrigado a todos os que contribuíram para a sua realização, em especial àqueles sem os quais este trabalho não se teria realizado:

- À Professora Fernanda Cosme, por me ter dado a oportunidade de, sob sua orientação, realizar uma investigação à imagem daquelas que tanto interesse me despertaram durante as suas aulas e sempre almejei fazer. Pela sua disponibilidade, apoio constante e por todos os conhecimentos transmitidos o meu muito obrigado.
- Ao Professor Fernando Nunes agradeço a forma acolhedora como me recebeu no seu laboratório, a disponibilidade e os muitos ensinamentos.
- Ao Professor Filipe Ribeiro agradeço os conhecimentos transmitidos e toda a ajuda na parte experimental.
- À Dra. Juliana Milheiro agradeço a simpatia no esclarecimento de todas as dúvidas e a grande ajuda que deu na parte experimental.
- A todo o painel de provadores da UTAD, especialmente à Professora Alice Vieira pela disponibilidade e pelo apoio prestado na parte da análise sensorial.
- Agradeço à S.A.I, em especial à sua equipa laboratorial a cedência de espaço e equipamentos e ajuda na concretização de algumas análises.
- À QUINTA D'AMARES e respetivo pessoal, em especial ao seu Diretor, Engenheiro José Alberto Pedrosa pela pronta cedência dos vinhos usados neste trabalho assim como pelas palavras amigas de conselho e incentivo.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS ORGÂNICOS DO VINHO

Da matriz complexa que constitui o vinho os ácidos orgânicos são dos mais importantes pois têm um papel fundamental quer nas suas características químicas quer nas suas propriedades sensoriais. De todos os ácidos presentes no vinho podem ser destacados os provenientes das uvas como o ácido tartárico, málico e cítrico e os provenientes do metabolismo dos microrganismos ácido láctico e acético.

O ácido orgânico presente em maior concentração e mais importante ao nível químico e sensorial do vinho é o ácido tartárico, especificamente o isómero L(+)-tartárico (Figura 1) que pode chegar aos 20 g/L no estado fenológico do pintor, sendo que a sua concentração na maturação se situa entre 3,8 e 11,3 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Após o período ótimo de maturação das uvas o teor de ácido tartárico dos mostos daí resultantes poderá situar-se apenas em quantidades entre 2 e 10 g/L, variando de acordo com a região, a casta, o tipo de solo e as práticas culturais. O segundo ácido mais abundante, o ácido málico, é sintetizado nas folhas e nas uvas, principalmente depois do pintor. No entanto, não existe ainda uma prova formal do transporte destes ácidos das folhas para as uvas (Ruffner,1982). É um ácido relativamente forte com pKa de 3,1, que lhe permite, devido à gama de concentrações a que se encontra nos vinhos, garantir um valor de pH ácido (Ribereau-Gayon et al., 2006).

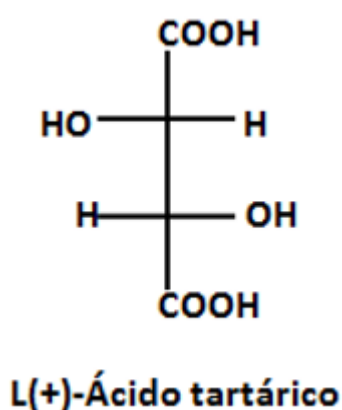


Figura 1- Estrutura química do ácido tartárico.

1.2. COMPOSIÇÃO MINERAL DO VINHO

O vinho é uma matriz na qual se encontram diversos cátions metálicos sendo o potássio o que se apresenta em maiores concentrações, representando cerca de 50% da matéria mineral presente no vinho. Também é possível encontrar os cátions cálcio, magnésio e os íons de ferro e cobre, mas normalmente em concentrações vestigiais (Alves, 1992).

O floema permite a translocação de açúcares provenientes da fotossíntese da folha para os bagos das uvas. O potássio é também ele deslocado na planta pelo mesmo mecanismo que os açúcares. Assim, durante a maturação, o aumento da concentração de potássio na uva está diretamente relacionado com a acumulação do açúcar (Andrade, 2012). Por esta razão o potássio é o principal cátion do vinho, sendo a sua concentração no produto final frequentemente elevada, com teores entre 0,5 e 2 g/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). O teor em potássio geralmente é mais elevado nos vinhos tintos que nos vinhos brancos e rosados, devido à extensão da sua extração, durante a fase de maceração e à inibição de precipitação pelos polifenóis que têm efeito de colóides protetores (Curvelo-Garcia, 1988).

Apesar da concentração de cálcio na maioria dos vinhos ser baixa, entre 30 a 200 mg/L (Flanzy, 2003), esta é significativa, quando o vinho é tratado com bentonite cálcica ativada ou carbonato de cálcio, para desacidificação do vinho (Nunes, 2011). O aumento de cálcio no vinho, também pode ter origem no armazenamento do vinho em depósitos de cimento desprotegidos (McKinnon et al., 1994).

1.3. ESTABILIDADE TARTÁRICA

Durante o processo de vinificação e de estágio pode ocorrer a precipitação de cristais dos sais que o ácido tartárico forma com os íons potássio e cálcio principalmente quando o mosto/vinho está exposto a baixas temperaturas (Lazanta et al., 2013). Mesmo após o engarrafamento certos vinhos têm um grande potencial para que ocorram estas precipitações em garrafa, sendo denominados como vinhos tartaricamente instáveis. Estas precipitações apesar de serem completamente naturais e não afetarem as características sensoriais do vinho causam um impacto negativo na maioria dos consumidores que associam a presença do precipitado a uma alteração ou defeito do vinho e por consequente rejeitam a compra (Ripa et al., 2013). Este facto leva à necessidade da estabilização tartárica dos vinhos que apresentam potencial de ocorrência de precipitações tartáricas.

Na gama de valores de pH que o vinho normalmente apresenta o ácido tartárico encontra-se preferencialmente ionizado. Dada a presença inevitável dos catiões potássio e cálcio, pode apresentar-se também sob três formas distintas (Ribéreau-Gayon et al., 1998) (Figura 2).

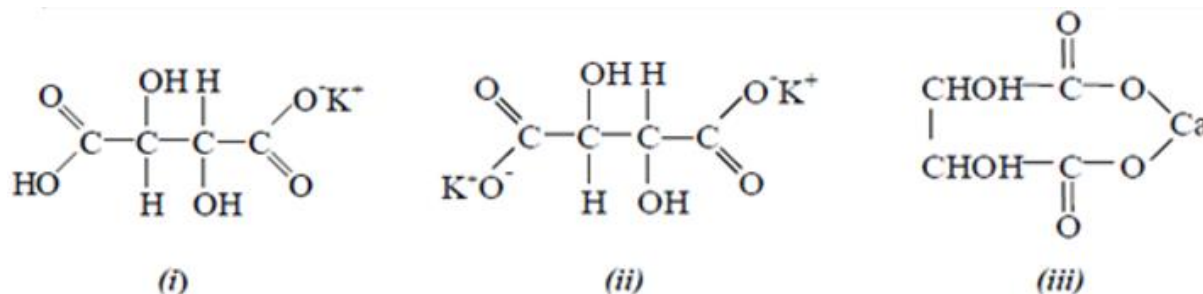
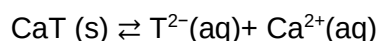
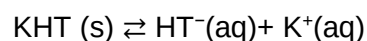


Figura 2 - Estrutura dos sais do ácido tartárico: i) Hidrogenotartarato de potássio; ii) Tartarato de potássio; iii) Tartarato de cálcio (Adaptado de Ribéreau-Gayon et al., 1998).

Dos três sais do ácido tartárico há dois que devido à sua grande abundância e baixa solubilidade no vinho têm grande importância do ponto de vista enológico, sendo eles o hidrogenotartarato de potássio (KHT) também denominado por bitartarato de potássio (KHT) e o tartarato de cálcio (CaT). As equações seguintes apresentam os equilíbrios de solubilidade dos sais de hidrogenotartarato de potássio e tartarato de cálcio, respetivamente:



O potássio é o principal catião do vinho, com teores entre 0,5 e 2 g/L após a fermentação alcoólica (Ribereau-Gayon et al.,1998), correspondendo ao valor mínimo de 0,5 g/L a 11,6 g/L de hidrogenotartarato de potássio, um valor que ultrapassa largamente a saturação em vinho a temperaturas normais, o que indica que a concentração de potássio não é um fator limitante para a formação de KHT.

Pelo facto de apresentar duas cargas positivas o cálcio é mais reativo que o potássio na precipitação e floculação de coloides (Ribereau-Gayon et al.,1998).

1.3.1 Processo de cristalização

A cristalização de hidrogenotartarato de potássio, tal como em outros sais simples, é caracterizada por três fases distintas (Salgues et al., 1982):

- **Fase de sobressaturação**

A sobressaturação do sal em questão é a condição essencial para haver precipitação, mas por si só não é suficiente para que aconteça a nucleação primária (Ribereau-Gayon et al., 1998).

Numa situação de equilíbrio químico, a concentração de cada ião em solução é ditada pela sua solubilidade, correspondendo a 5,7 g/L para o hidrogenotartarato de potássio e 0,53 g/L para o tartarato neutro de cálcio em água a 20 °C (Ribereau-Gayon et al., 2006). A constante de equilíbrio é dada por:

$$K_{psKHT} = [HT^-][K^+]$$

$$K_{psCaT} = [T^{2-}][Ca^{2+}]$$

Quando o valor do produto das concentrações dos iões é igual à constante de equilíbrio (K_{ps}) a solução designa-se por solução saturada e não há precipitação. Se o produto das concentrações efetivas for inferior à constante de equilíbrio, a solução está não saturada, o que significa que mais soluto pode ser dissolvido. Quando o produto de concentrações ultrapassa o valor da constante de equilíbrio, passa a existir uma solução sobressaturada, onde poderá ocorrer a precipitação sob a forma de cristais.

- **Fase de nucleação**

Para se dar a precipitação de KHT é necessária a formação de pequenos núcleos de cristalização a partir dos quais ocorre o crescimento dos cristais. A formação desses pequenos núcleos numa fase líquida requer uma grande quantidade de energia, denominada energia interfacial de superfície. Isto deve-se à formação de uma interface entre as duas fases (Ribereau-Gayon et al., 1998).

A cristalização é um fenómeno lento em que a parte fundamental do cristal de KHT é o núcleo, que pode ser formado por dois ou quatro pares iónicos (Piracci e Garafolo, 1990).

- **Fase de crescimento**

Para haver crescimento dos cristais é necessário registarem-se três condições, sendo as duas primeiras correspondentes às duas fases anteriores de sobressaturação e nucleação e a última referente à ausência de coloides protetores (Dunsford e Boulton, 1981).

A velocidade de cristalização é diretamente proporcional à superfície de adsorção dos núcleos existentes e ao grau de sobressaturação do vinho, sendo dada pela seguinte equação (Berg e Keefer, 1958):

$$V=k*S*(C-CS)$$

Em que:

V – Velocidade de cristalização;

S – Superfície de adsorção;

C – Concentração real de bitartarato no vinho;

CS – concentração correspondente à saturação no mesmo vinho;

(C-CS) – grau de sobressaturação do vinho.

1.3.2 Fatores condicionantes da cristalização

- **Álcool**

O hidrogenotartarato de potássio é solúvel em água, e relativamente insolúvel em álcool visto que este ao ser menos polar que a água será menos capaz de dissolver compostos polares e iónicos como é o caso dos sais (Vigara e Amores, 2010). Numa solução hidroalcoólica a 10 % (v/v) a 20 °C a sua solubilidade é de apenas 2,9 g/L ao contrário dos 5,7 g/L para a água (Ribéreau-Gayon et al., 2006) sendo inversamente proporcional ao teor alcoólico (Berg e Keefer, 1958). Este facto explica a grande quantidade de precipitações tartáricas durante a fermentação alcoólica.

- **Temperatura**

Tal como em todos os equilíbrios químicos também no caso do KHT o aumento de temperatura leva a um aumento da sua constante de equilíbrio e, conseqüentemente, a um aumento da concentração de KHT que determinado vinho consegue dissolver. Desta forma

entende-se que a solubilidade de KHT seja diretamente proporcional à temperatura (Berg e Keefer, 1958).

- **pH**

Assim como em qualquer ácido o pH influencia o equilíbrio de dissociação do ácido tartárico (Berg e Keefer, 1958) e por isso também influencia as relações $H_2T/HT^-/T^{2-}$ visto que quanto menor for o valor de pH haverá uma maior abundância de prótons no meio e maior tendência o ácido terá de estar protonado. O potencial de precipitação de KHT será máximo quando a proporção de HT^- for também ela máxima. A Figura 3 representa a fração molar das diferentes espécies de ácido tartárico, em função do pH, numa solução aquosa, sendo que, nesta situação, e a um valor de pH igual a 3,69 que se regista a proporção máxima de HT^- e consequentemente o maior potencial de precipitação de hidrogenotartarato de potássio.

Também segundo a Figura 3 se observa que é apenas a partir do valor de pH de 3,5 que existe uma fração molar significativa de T^{2-} o que implica que é só a partir desse valor que começa a haver risco de precipitação de tartarato de cálcio.

Segundo Vigara e Amores (2010) a percentagem de etanol influencia o valor de pH a que se regista a proporção máxima de HT^- sendo tanto mais elevado quanto maior for a percentagem de etanol. Por exemplo, um vinho de 11% (v/v) em etanol, apresenta uma concentração máxima de HT^- ao pH de 3,9.

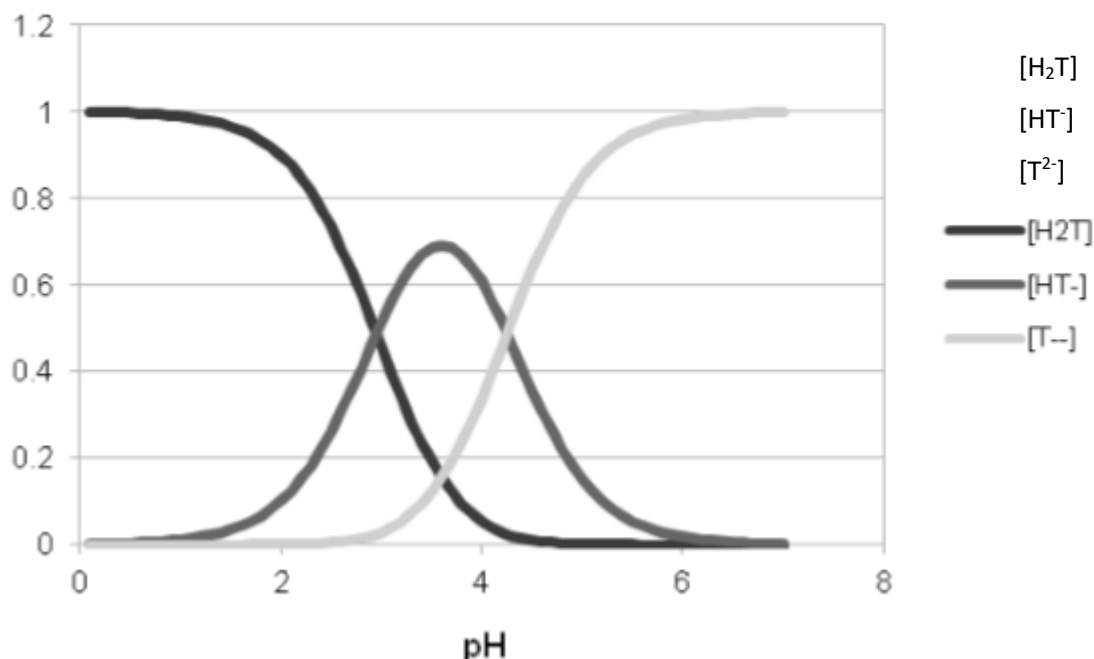


Figura 3 - Distribuição das frações ionizadas do ácido tartárico em função do pH.

-

- **Agitação**

A agitação condiciona a cristalização visto que a velocidade de cristalização está dependente da movimentação do vinho em torno da superfície cristalina (Ribéreau-Gayon et al., 2006). A influência da agitação do vinho na cinética de cristalização verifica-se no favorecimento da formação de um maior número de núcleos de pequenas dimensões o que aumenta a área superficial e promove uma nucleação mais rápida (Dunsford e Boulton, 1981; Boulton, 1982) visto que com uma maior agitação aumenta a probabilidade do encontro entre as moléculas de KHT e entre estas e os núcleos/cristais.

A agitação do vinho também faz com que haja uma uniformidade na distribuição dos núcleos, pela diminuição das distâncias de difusão, requerendo assim menor energia potencial para ligação dos iões K^+ e HT^- aos vários pontos ativos do cristal (Dunsford e Boulton, 1981).

- **Força iónica**

Os ácidos málico, láctico (Usseglio-Tomasset et al., 1980) e cítrico e o magnésio (Berg e Keefer, 1958) interferem com a solubilidade do KHT. Também foi observado que vinhos com teores mais altos de sólidos solúveis apresentam maior precipitação de KHT (Berg e Keefer, 1958) concluindo-se por isso que a solubilidade do KHT está diretamente relacionada com força iónica, já que esta representa a concentração total de iões numa solução. Por esta razão conclui-se que a solubilidade dos tartaratos é inversamente proporcional à força iónica do vinho.

- **Dimensão das partículas**

A velocidade de cristalização do hidrogenotartarato de potássio no vinho depende também do tamanho dos núcleos de cristalização. A velocidade é inversamente proporcional ao tamanho dos núcleos visto que foi observado por Maujean et al. (1986) e Garcia-Ruiz et al. (1995) que foram os cristais de granulometria inferior a 50 μm os mais eficazes na etapa de crescimento do KHT.

- **Presença de coloides protetores**

Os compostos designados por coloides protetores, tais como proteínas, compostos fenólicos, polissacarídeos e outros compostos de elevado peso molecular, inibem a migração dos iões de bitartarato de potássio para os núcleos dos cristais formados. Os coloides são adsorvidos pelas faces dos cristais, bloqueando a ligação de novas moléculas de hidrogenotartarato de potássio nos cristais formados, impedindo conseqüentemente o seu crescimento (Berovic e Kosmerl, 2008). Os coloides protetores formam, também, ligações com o ácido tartárico livre

e os iões de potássio, o que anula a sua disponibilidade para formar hidrogenotartarato de potássio (Low, 2007). A presença de coloides na composição do vinho justifica o facto de a solubilidade do bitartarato de potássio ser maior no vinho comparativamente ao que acontece em soluções modelo com as mesmas concentrações de etanol e bitartarato de potássio em condições idênticas de temperatura (Batista et al., 2010). Os vinhos tintos e os vinhos licorosos contêm concentrações elevadas de coloides protetores (Lasanta e Gómez, 2012) e é por esta razão que, normalmente, apresentam uma maior estabilidade tartárica que os vinhos brancos e rosados.

1.3.3 Determinação da estabilidade tartárica

Existem vários métodos disponíveis para a avaliação da estabilidade tartárica de um vinho sendo que alguns quantificam a instabilidade do vinho (métodos quantitativos), e outros apenas determinam a existência de estabilidade (métodos qualitativos).

- **Teste da câmara frigorífica**

O teste da câmara frigorífica é um teste empírico e geralmente apenas usado em empresas de pequena escala. Consiste na exposição de uma garrafa de vinho transparente à temperatura de -4 °C durante 6 a 8 dias. Existe também a variante deste teste denominado por teste de congelação em que o vinho é exposto a -18 °C durante 6 horas. A instabilidade tartárica é verificada, se, no final do teste, à temperatura ambiente, se observar a presença de cristais. Apesar de ser um teste extremamente prático apresenta graves falhas, na medida em que é pouco fiável e lento, dado o carácter aleatório do fenómeno de cristalização espontânea, não fornecendo uma indicação concreta do grau de instabilidade do vinho (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

- **Teste da temperatura de saturação ou de Würdig**

Würdig et al. (1982) verificaram que a baixas temperaturas, quanto maior a quantidade de KHT que um vinho for capaz de dissolver, menor será o seu grau de sobressaturação em relação a este sal, tendo assim uma maior estabilidade tartárica. Com esta conclusão foi introduzido o conceito de temperatura de saturação de um vinho. A temperatura de saturação (T_s) corresponde à temperatura mais baixa capaz de dissolver bitartarato de potássio exógeno. Quanto mais alta for a T_s maior é o risco de haver precipitação tartárica devido ao abaixamento da temperatura.

Para a determinação da T_s a amostra é arrefecida até aos 0 °C, e posteriormente a um aumento de temperatura na ordem de 0,5 °C/min até aos 30 °C sendo sujeita a agitação. Um eletrodo de condutividade mergulhado na amostra faz a leitura da condutividade elétrica em cada ponto de temperatura sendo que a representação gráfica das leituras de condutividade será dada por uma reta com declive positivo. Arrefece-se novamente a amostra até aos 0 °C e é-lhe adicionado bitartarato de potássio na concentração de 4 g/L. A amostra é novamente aquecida numa velocidade de 0,5 °C/min até aos 30 °C o gráfico das leituras de condutividade será dado por uma reta paralela e inferior à primeira, mas que a partir de certa abcissa adota a forma de curva ascendente que interceta a primeira reta num determinado ponto sendo que a abcissa deste ponto corresponde à temperatura de saturação (Figura 4) (Würdig et al., 1982).

Numa tentativa de minimizar o tempo gasto para realizar este ensaio, Würdig et al. (1982), estabeleceram uma correlação linear para vinhos brancos com base em estudos estatísticos de várias centenas de vinhos, definida pela expressão seguinte:

$$T_s = 20 - ((\Delta L)20\text{ °C}) / 29,30 \text{ em que,}$$

$(\Delta L)20\text{ °C}$ é a diferença de condutividade elétrica da amostra de vinho em análise sem e com a adição de KHT à temperatura de 20 °C.

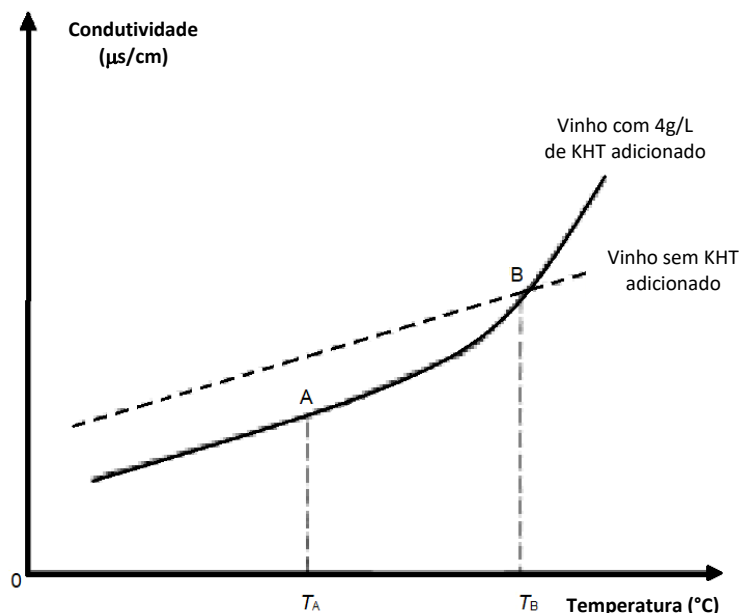


Figura 4- Determinação experimental da temperatura de saturação (adaptado de Würdig et al., 1982).

Para vinhos rosados e tintos Maujean et al. (1985) sugeriram a seguinte extensão da equação de Würdig:

$$T_s = 29,90 - ((\Delta L)30 \text{ }^{\circ}\text{C}) / 58,30 \text{ em que,}$$

$(\Delta L)30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ é a diferença de condutividade elétrica da amostra de vinho em análise sem e com a adição de KHT à temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A vantagem do uso destas equações é que permite uma determinação da T_s de uma forma rápida, usando somente duas medições.

Quanto mais baixa é a temperatura de saturação de um determinado vinho, menos sobressaturado se encontra e, portanto, mais baixo será o valor real da temperatura que garante a sua estabilidade tartárica. Este valor de temperatura é designado por temperatura de estabilidade tartárica do vinho ou temperatura crítica de cristalização (Test ou TCC) e representa a temperatura mínima para a qual não há risco de cristalização. Para calcular este valor é necessário saber o domínio de sobressaturação (DS) do vinho, que vai ser a diferença entre a temperatura de saturação e a respetiva temperatura de cristalização. Foi determinado, também por Maujean et al. (1985) que vinhos brancos com um teor alcoólico de $11 \text{ } \%$ (v/v). e desprovidos de coloides protetores possuem um DS de $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$, assim a fórmula para a determinação da Test ou TCC dos vinhos brancos com um TAV $\leq 11 \%$ (v/v). é:

$$\text{Test ou TCC} = T_s - 15 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Segundo Ribéreau-Gayon et al. (1998) vinhos brancos com um teor alcoólico de $12,5 \text{ } \%$ (v/v). e vinhos base para espumante, que são mais ricos em coloides, apresentam um DS = $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo por isso a Test ou TCC é determinada com recurso à fórmula:

$$\text{Test ou TCC} = T_s - 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Segundo Gaillard et al. (1990), a Test de vinhos tintos será calculada através da fórmula:

$$T_s < (10,81 + 0,297 \text{ IPT}) \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ em que,}$$

IPT é o índice de polifenóis totais (por exemplo um vinho rico em polifenóis, IPT = 50 encontra-se estável se $T_s < 25,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$; enquanto que um vinho pobre em polifenóis, IPT = 30 encontra-se estável se $T_s < 19,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

- **Teste de mini-contacto ou da condutividade elétrica**

O teste do mini-contacto baseia-se na determinação da condutividade elétrica do vinho sendo um procedimento rápido e fácil em que se usa um condutímetro. A condutividade vai ser diretamente proporcional à quantidade de iões presentes no vinho, nomeadamente do ião potássio, dado que é o ião que existe em maior concentração no vinho (Cardoso, 2007). Este teste baseia-se na nucleação homogénea induzida por núcleos de cristalização exógenos, pela sua rapidez relativamente à nucleação espontânea, exigindo, por isso, a adição de sais de bitartarato de potássio para induzir a precipitação do bitartarato de potássio (Flanzy, 2003). A amostra de vinho é arrefecida até 0 °C e é medida a sua condutividade inicial. Posteriormente, é adicionado bitartarato de potássio ao vinho numa concentração de 4 g/L, que é sujeito a uma agitação constante, para obter a sobressaturação e iniciar o crescimento dos cristais. A medição da queda da condutividade é efetuada até que esta estabilize sendo que geralmente este processo demora 2 horas. Se a diferença de condutividade, inicial e final, for inferior a 5% considera-se que o vinho está estável, se os valores forem superiores a 5 % o vinho é considerado instável, necessitando de tratamento. Existem também aparelhos de medição semiautomáticos que usam tabelas próprias de intervalos de diferenças de condutividades em vez da regra dos 5 % anteriormente referida. Este teste define a estabilidade do vinho a 0 °C e no estado coloidal no momento do teste, não tendo em conta a possibilidade de uma reestruturação coloidal do vinho durante o seu envelhecimento (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

1.4 MÉTODOS DE ESTABILIZAÇÃO TARTÁRICA

Atualmente estão disponíveis e são usados vários métodos de estabilização tartárica que podem ser divididos em dois grandes grupos, os métodos subtrativos e os métodos aditivos. Os métodos subtrativos são caracterizados por remover uma parte dos iões potássio e cálcio e assim impedir a cristalização enquanto que os métodos aditivos são caracterizados pela adição de coloides protetores ao vinho que impedem a cristalização.

1.4.1 Estabilização por frio

O método de estabilização tartárica por ação do frio tem por base a diminuição da solubilidade dos tartaratos e consequente precipitação pela diminuição da temperatura. Para a execução deste processo é necessário arrefecer o vinho até uma temperatura próxima do ponto de congelação. Esta por sua vez depende essencialmente do teor em etanol do vinho sendo que

Ribereau-Gayon et al. (1998) desenvolveram as seguintes equações para calcular a temperatura de congelação e a temperatura de tratamento:

$$\text{Temperatura de tratamento (}^{\circ}\text{C)} = - [\text{etanol (\%v/v) do vinho}/2] + 1$$

$$\text{Temperatura de congelação (}^{\circ}\text{C)} = - [\text{etanol (\%v/v) do vinho} - 1] / 2$$

Para que o vinho seja corretamente estabilizado a temperatura de tratamento terá de ser mais baixa que a previsível durante o seu transporte, armazenamento e no serviço ao consumidor (Boulton et al., 1995).

1.4.1.1 Estabilização espontânea

Este método apesar de na grande maioria dos casos ser efetuado com recurso a equipamentos de refrigeração pode ser atingido, em casos particulares, pelo frio natural que ocorre no inverno, principalmente em vinhos que sofrem um estágio prolongado.

1.4.1.2 Estabilização descontínua

- **Estabilização lenta sem adição de cristais de KHT**

Este processo descontínuo é a técnica mais tradicional e amplamente usada de estabilização tartárica e baseia-se no arrefecimento e geralmente armazenamento do vinho em cubas isotérmicas ou câmaras de refrigeração a uma temperatura próxima do ponto de congelação, ($T (^{\circ}\text{C}) = - (\text{etanol \% (v/v)}/2) + 1$). A baixa temperatura induz a formação de núcleos endógenos de bitartarato constituindo a nucleação primária, que ao fim de alguns dias dá lugar à cristalização do bitartarato de potássio em excesso para essa temperatura (Blouin, 1982). O tempo de duração do tratamento depende do tipo de vinho a tratar. Em vinhos tintos como a precipitação é mais lenta devido à ação dos colóides protetores o tempo de tratamento é maior que o usado em vinhos brancos e rosados.

As desvantagens deste processo estão diretamente relacionadas com o tempo de execução visto que a conservação do vinho a temperaturas baixas durante muito tempo pode levar à dissolução de oxigénio (cerca 11 mg/L a 0 °C e 8 mg/L a 15 °C) com posterior oxidação do vinho, uma vez que os gases se dissolvem mais rapidamente a baixas temperaturas (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Este método é também bastante dispendioso na medida em que são necessários grandes gastos energéticos para o arrefecimento e manutenção das baixas temperaturas. Uma outra possível desvantagem será a precipitação de matéria coloidal

fenólica instável, principalmente de matéria corante Ribéreau-Gayon et al. (1972) sendo uma desvantagem em vinhos destinados a serem consumidos jovens já que esses vinhos apresentarão menos cor, mas que se torna uma vantagem no caso dos vinhos destinados ao envelhecimento em garrafa visto que esta matéria coloidal precipitaria naturalmente na garrafa com o passar dos anos.

- **Estabilização rápida com adição de cristais de KHT**

Sendo bastante semelhante à estabilização lenta este processo baseia-se no arrefecimento e armazenamento do vinho a uma temperatura próxima de 0 °C, com adição de cristais de bitartarato de potássio de granulometria inferior a 60 µm, na concentração de aproximadamente 4 g/L, originando desta forma uma superfície de cristalização considerável. (Flanzy, 1998), sendo que estes funcionam como núcleos de cristalização, ultrapassando assim a fase de nucleação primária. Neste método deve ser assegurada uma agitação da suspensão, que deverá ser tanto maior quanto maior for a abundância coloidal do vinho (Blouin, 1982).

Comparativamente com a técnica anterior, esta permite reduzir o tempo de tratamento para 4 horas, ou por vezes menos para vinhos brancos, tornando possível efetuar 2 a 3 ciclos de tratamento por dia. O vinho ao ser mantido a 0 °C em vez de temperaturas negativas permite alguma economia energética. No entanto, o preço elevado dos cristais apresenta-se como desvantagem do processo, sendo minimizada pela reutilização dos mesmos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Em vinhos tintos novos é possível a reutilização dos cristais de 2 a 3 vezes, e 5 a 10 vezes em vinhos brancos secos, desde que garantida a sua perfeita qualidade microbiológica e sensorial (Blouin, 1982). A eficácia da reutilização dos cristais foi demonstrada por Maujean et al. (1986), não recomendando estes autores a reutilização em vinhos tintos devido à adsorção de compostos fenólicos na superfície dos cristais ocasionar perda de eficiência dos mesmos. Foi ainda demonstrado por Mínguez e Hernández (1998) que é possível estabilizar simultaneamente o vinho em relação ao KHT e ao CaT utilizando cristais de CaT, uma vez que a adição de cristais de CaT induz a cristalização do KHT, mas o inverso não se verifica.

1.4.1.3 Estabilização contínua

É um método contínuo de estabilização tartárica em que se provoca o arrefecimento rápido do vinho, e onde o tempo de tratamento é definido pelo caudal tratado em função do volume

do cristalizador e pelo estado de sobressaturação do vinho (Blouin, 1982; Escudier et al., 1998; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A circulação do vinho realiza-se através de um permutador antes de entrar no cristalizador em agitação contínua. No permutador, é sujeito a um choque térmico até temperatura próxima do seu ponto de congelação, permanecendo aí algum tempo após o que sai, sendo filtrado ou centrifugado à temperatura do tratamento para evitar a dissolução do KHT (Blouin, 1982; Andrade, 2012). A crioconcentração gerada pelo choque térmico leva a um aumento momentâneo do teor alcoólico favorecendo a sobressaturação necessária para a nucleação primária. Reúnem-se assim dentro do cristalizador as condições ideais para o rápido crescimento dos cristais devido ao estado de sobressaturação e à turbulência.

O tratamento em contínuo torna-se exigente em termos de controlo do processo, exigindo metodologia rápida de controlo da eficácia com vista a determinar a necessidade ou não da recirculação do vinho no cristalizador. É também de extrema importância o controlo da qualidade dos cristais. Apesar de ser um método rentável para grandes volumes de vinho a sua eficácia é consideravelmente menor que os métodos de estabilização descontínua podendo haver necessidade de ser complementado com outros tipos de tratamentos.

1.4.2 Estabilização por aditivos enológicos

A adição de produtos enológicos com propriedades de coloide protetor é um dos métodos usados para conferir estabilidade tartárica aos vinhos, existindo já vários coloides protetores aprovados pelo OIV e amplamente usados. Estas substâncias apresentam eficácias distintas.

1.4.2.1 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um derivado da celulose obtido por esterificação dos grupos álcool primários livres das unidades de glucopirranose através de ligações glicosídicas. É caracterizada por dois parâmetros, o grau de substituição (GS) e o grau de polimerização (GP), sendo que o grau de substituição representa a razão entre o número de unidades de glucose substituídas com grupos carboximetil com o número total de unidades de glucose (Crachereau et al., 2001) e o grau de polimerização representa a número médio de unidades de glucose por cadeia polimérica (Stojanovic et al., 2005) (Figura 5).

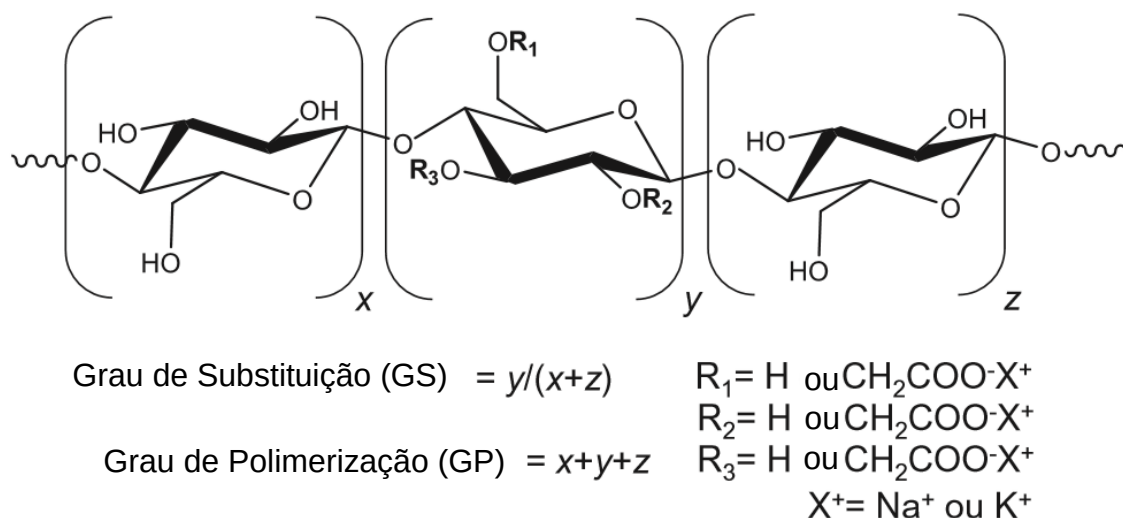


Figura 5 – Estrutura química da carboximetilcelulose (Adaptado de Guise et al. 2014).

Usado desde a década de 1940 como emulsionante na indústria alimentar (E466) em concentrações até 10 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006) o CMC tem ainda aplicações nas indústrias dos detergentes, do papel, têxtil, farmacêutica e da tinta (Methacanon et al., 2003). O seu uso na enologia foi aprovado pelo OIV em 1 de agosto de 2009 (OIV, 2017) sendo a dose máxima admitida no vinho de 100 mg/L (Greeff et al., 2012). O GS aprovado para uso enológico tem de estar compreendido entre 0,60 e 0,95 e o GP entre 80 e 1,500 (OIV, 2017).

O CMC apresenta carga negativa (aos valores de pH do vinho) permitindo a adsorção dos cristais de THK, inibindo o seu crescimento. O mesmo acontece aos iões K^+ e Ca^{2+} , provocando a diminuição dos iões livres, que participam na cristalização (Rodriguez-Clemente e Correa-Gospore, 1988; Flanzky et al., 2003). Atua ainda ao nível da forma dos cristais de KHT retardando a sua formação, duas das sete faces do cristal são perdidas na presença deste composto, alterando as suas dimensões e, consequentemente, o seu achatamento (Greeff et al., 2012). A eficácia do CMC com um determinado grau de polimerização como coloide protetor é tanto maior, quanto maior for o seu grau de substituição, tendo em conta que é também maior o número de locais para a adsorção de catiões (Lubbers et al., 1993; Guise et al., 2014).

Segundo Salagoity et al. (2010) o CMC não altera as características sensoriais do vinho até a um nível quinze vezes superior ao máximo autorizado. No entanto, Scotti et al. (2010) descreve que a CMC de elevado peso molecular forma soluções de elevada viscosidade, alterando a perceção de volume e a estrutura do vinho. Alguns autores fizeram a comparação da utilização do CMC com outros aditivos enológicos para a estabilização tartárica, concluindo

que o CMC apresenta vantagens sendo um produto economicamente viável, fácil de usar e inerte (Crachereau et al., 2001). É, também, estável quando aplicado em vinho durante períodos superiores a 12 meses e em temperaturas elevadas (Greeff et al., 2012). Bowyer et al. (2010) referem, ainda, que não há modificação química no vinho comparativamente à utilização das manoproteínas, não há alteração no pH do vinho comparativamente à aplicação do ácido metatartárico ou das características sensoriais contrariamente à estabilização do vinho por eletrodiálise.

Segundo Moutounet et al. (2010) e Davaux et al. (2013) não é recomendada a estabilização com CMC em vinhos tintos e rosados com matéria corante instável, visto que este interage pelo menos em parte, com as frações de compostos fenólicos, formando agregados intermoleculares. Estes agregados podem-se tornar insolúveis dependendo do seu tamanho e das condições ambientais sendo particularmente sensíveis a temperaturas baixas. No entanto tanto Claus et al. (2014) como Sommer et al. (2016) referem que a CMC causa precipitações de matéria corante apenas em vinhos tintos com instabilidade proteica sendo que 50% da massa do depósito formado é constituído por proteínas.

1.4.2.1 Manoproteínas

As manoproteínas são glicoproteínas que existem naturalmente no vinho sendo provenientes das paredes celulares das leveduras através da sua autólise. São, por isso, libertadas durante a fermentação alcoólica e durante o estágio do vinho em borras finas. São co-polímeros dos monossacarídeos glucose e manose unidos a proteínas. Existem também sob a forma de aditivos comerciais aprovados pelo OIV podendo ser extraídas quimicamente a quente, ou por via enzimática com a utilização de β -glucanases para hidrolisar as glucanas e assim libertar as manoproteínas (Moine-Ledoux e Dubourdieu, 2002). O uso de manoproteínas de leveduras para a estabilização tartárica e/ou proteica do vinho é autorizado nos países da União Europeia (modificação do Regulamento (CE) n.º 1493/1999 da OCM para o Regulamento (CE) n.º 2165/2005 do conselho de 20 de Dezembro de 2005).

As manoproteínas melhoram as características sensoriais dos vinhos, apresentando mais volume e sensação de doçura, além de apresentarem uma maior estabilidade da cor. Podem, também, ser usadas como estabilizador proteico com efeito comprovado (Ribeiro et al., 2014). No entanto, a sua eficácia como coloide protetor para a estabilização tartárica ainda é muito controversa havendo resultados contraditórios em diferentes estudos. Lubbers et al. (1993) demonstraram que as manoproteínas extraídas da parede celular de leveduras, particularmente aquelas com maior teor em proteína, eram inibidoras naturais da cristalização

do bitartarato de potássio. Posteriormente, no entanto, Moine et al. (1996), sugerem que as manoproteínas parecem ter um efeito mínimo sobre a cristalização do KHT. Em 2006 Ribéreau-Gayon et al. demonstraram que a mesma dose de manoproteínas extraídas por digestão enzimática apresentava um maior efeito estabilizador que as manoproteínas extraídas pelo calor. As primeiras são mais ricas em proteínas e a fração de polissacáridos é constituída apenas por manose, enquanto as manoproteínas extraídas pelo calor possuem também glucose, tendo, cada tipo, diferentes estruturas, dependendo de seu peso molecular, grau e tipo de glicosilação (Moine-Ledoux e Dubourdieu, 2002).

1.4.2.3 Ácido metatartárico

O ácido metatartárico $[C_4H_6O_6]_n$ é um poliéster resultante da esterificação do ácido tartárico entre a função ácida de uma molécula de ácido tartárico e a função álcool secundária de outra (Figura 6), com perda da acidez e libertação de água a temperaturas elevadas (150 a 160 °C) (Ribéreau-Gayon et al., 2006), tendo um índice de esterificação variável entre os 30 e os 40%. É uma substância fortemente higroscópica, pelo qual deve ser armazenada em local seco, de modo a não comprometer a sua estabilidade. Não é um produto puro, pode conter ácido oxaloacético, mas a sua principal impureza é o ácido pirúvico que representa de 1 a 6 % do peso do ácido metatartárico (dependendo das condições de produção). Pode obter-se um produto mais puro, se o aquecimento for feito a pressão reduzida e a uma temperatura ligeiramente inferior. A sua adição ao vinho é admitida na dose máxima de 100 mg/L (Regulamento (CE) nº 606/2009 da Comissão de 10 de Julho de 2009) sendo descrito como aditivo alimentar E353.

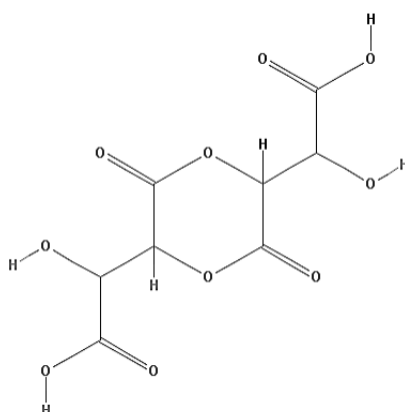


Figura 6 – Estrutura química do ácido metatartárico (Adaptado de Pubchem Open Chemistry Database, 2018).

O ácido metatartárico inibe o crescimento de núcleos de cristalização em torno dos quais os cristais de bitartarato de potássio e de tartarato neutro de cálcio se formam, bloqueando o processo de crescimento dos cristais, o que faz com que impeça a precipitação do bitartarato de potássio e do tartarato neutro de cálcio (Curvelo-Garcia, 2005). É altamente solúvel em água e em álcool e é rapidamente hidrolisado em solução aquosa a 100°C, mas mais lentamente a temperaturas baixas, o que leva à perda do seu efeito protetor tal como demonstrado no Quadro 1 (Ribéreau-Gayon et al., 2006) sendo que após a sua aplicação no vinho deve ser garantida a sua manutenção e armazenamento a baixas temperaturas.

Quadro 1 – Duração do efeito protetor do ácido metatartárico *versus* temperatura de conservação do vinho (adaptado de Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Temperatura de conservação	Duração do efeito protetor
0 °C	> 24 meses
10 a 12 °C	24 meses
12 a 18 °C	12 a 18 meses
20 °C	1 a 3 meses
30 °C	1 semana
35 a 40 °C	Poucas horas

1.4.2.4 Goma arábica

A goma-arábica é uma mistura complexa de polissacáridos e glicoproteínas elaborada a partir da exsudação natural de ramos e troncos de algumas espécies de árvores da família de acácias africanas, com cinco ou mais anos de idade quando submetidos a condições de stress, tais como o solo pobre e seco. É usada como um tratamento preventivo para as casses cúprica e férica e também para evitar a precipitação de compostos fenólicos e de matéria corante em vinhos tintos, sendo geralmente mais eficaz em vinhos tintos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Também é já conhecido há muito a eficácia moderada que a goma arábica apresenta no retardamento das precipitações tartáricas, sendo que Cantarelli já a havia descrito em 1963.

1.4.3 Estabilização por eletrodialise

A eletrodialise é um processo físico de separação de iões e catiões de moléculas neutras em solução. O processo da eletrodialise é baseado nas propriedades seletivas de membranas que permitem somente a passagem de catiões ou de aniões no seu respetivo tipo de

membrana (Escudier et al., 1998; Ribéreau-Gayon et al., 1988), estando estas em posições alternadas no esquema de disposição do equipamento. Os iões são forçados a deslocarem-se através das membranas nas quais são permeáveis através de uma diferença de potencial gerada por um ânodo e um cátodo localizados nas extremidades da célula de eletrodiálise. Os catiões (principalmente K^+ , Na^+ e Ca^{2+}) passam através da membrana permeável a catiões e são retidos no compartimento do concentrado, porque a próxima membrana é apenas permeável aos aniões. Do mesmo modo, os aniões (principalmente HT^-) são atraídos para o eletrodo positivo, passando através da membrana permeável a aniões e são acumulados no compartimento do concentrado, uma vez que a membrana seguinte é apenas permeável aos catiões. Esta permeabilidade seletiva é conseguida através da inserção de grupos químicos carregados que ficam ligados à matriz polimérica que constitui as membranas (Santos et al., 2000). O esquema de uma célula de eletrodiálise está exemplificado na Figura 7.

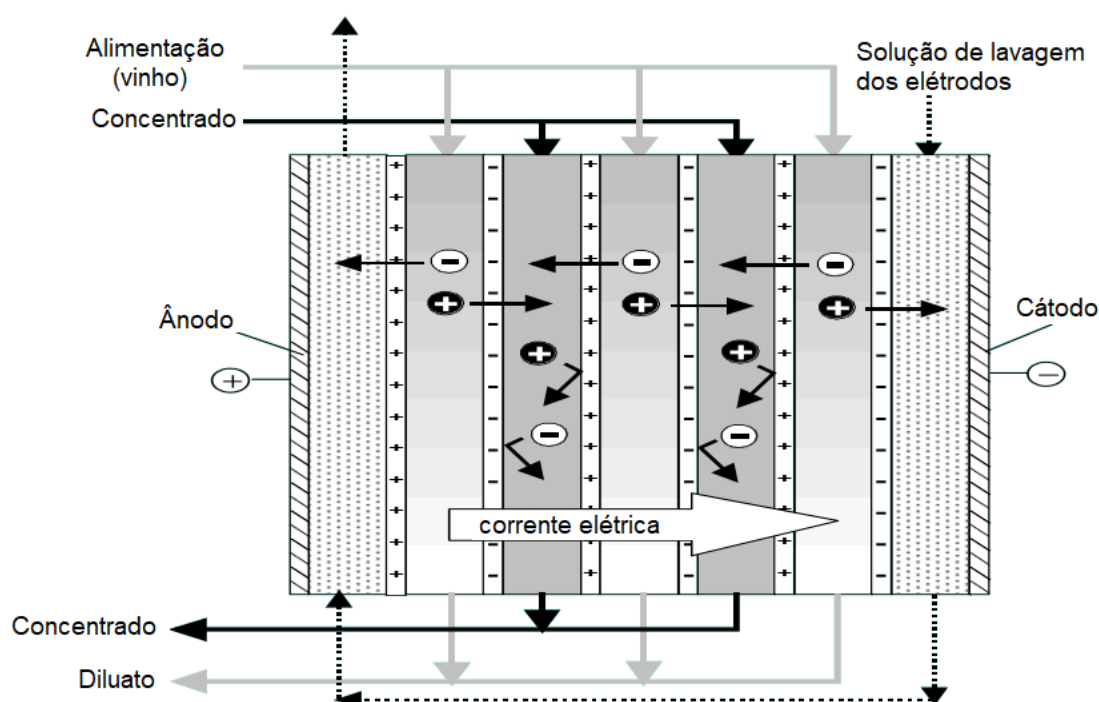


Figura 7- Esquema de funcionamento de uma unidade de eletrodiálise (Adaptado de Santos et al., 2000)

O processo de eletrodiálise estabiliza o vinho tartaricamente através da remoção de parte dos iões K^+ e Na^+ , sendo que diminui também o ácido tartárico, assim como a acidez volátil e o álcool (Cardoso, 2007). Também são reduzidos ligeiramente os compostos fenólicos, os polissacáridos e os aminoácidos (Ribéreau-Gayon et al., 1998). A matéria corante e os compostos voláteis são pouco afetados por este processo, uma vez que as membranas de eletrodiálise são constituídas por uma matriz densa e não microporosa como as membranas

de filtração, impedindo a migração de moléculas de grande peso molecular ou sem carga elétrica, como os compostos responsáveis pela cor ou os aromas (Santos et al., 2000). Apresenta também um custo energético baixo, representando uma grande poupança relativamente ao tratamento pelo frio (Bories et al., 2010) no entanto, o custo do equipamento é muito elevado. Apesar das vantagens que esta técnica apresenta (Benítez et al., 2003) referem que a eletrodialise diminui as características sensoriais quando comparada com a estabilização pelo frio.

1.4.4 Estabilização por resinas de troca iónica

É um processo no qual os iões de uma determinada carga presentes numa solução são trocados dessa solução por adsorção no permutador de iões. O permutador, sólido e insolúvel na água, mas hidratado, pode ser estar na forma salina, ácida ou básica, podendo o seu teor de água ser superior a 50% da sua massa total. É nesta quantidade de água (de hidratação) que ocorrem as trocas iónicas. O objetivo é que esses iões alvo sejam substituídos por equivalente quantidade de outros iões de carga igual cedidos pelo permutador, não sendo os iões de carga oposta afetados pelo processo.

As resinas são polímeros insolúveis, ativadas com grupos funcionais, sendo a sua base uma mistura de estireno e divinil-benzeno. O grupo funcional para os trocadores de catiões, é o ácido sulfónico, enquanto para os trocadores de aniões é a amónia quaternária sendo que geralmente têm afinidade específica para a adsorção de diferentes iões. As resinas de trocas catiónicas que são utilizadas para a estabilização tartárica do vinho trocam os catiões K^+ e Ca^{2+} , substituindo-os por Na^+ e H^+ (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Deste modo, diminui-se o estado de sobressaturação do KHT e do CaT, permitindo a sua solubilidade e evitando a posterior cristalização e precipitação no vinho. As resinas de troca iónica são um método de estabilização muito económico, mas que apresenta uma grande desvantagem, na medida em que alteram o perfil sensorial do vinho através da diminuição do seu pH e aumentando a acidez, sendo por isso muito difícil de gerir (Scotti et al., 2010).

1.4.5 Custos e impactos ambientais dos métodos de estabilização tartárica

Lasanta e Gómez (2012) fizeram uma análise de custos dos diferentes métodos de estabilização considerando os custos diretos de consumo energético, trabalho, gastos com químicos, consumíveis, água e perdas de vinho, e ainda o custo indireto da amortização dos equipamentos considerando vidas de serviço de dez anos. A comparação encontra-se resumida no quadro 2:

Quadro 2 - Custos dos diferentes métodos de estabilização tartárica (adaptado de Lasanta e Gómez, 2012).

Referência	Método	Custos diretos (€/hL)	Custos indiretos (€/hL)	Custos totais (€/hL)
Gomez et al. (2002)	Frio	0,76	0,19	0,95
	Troca iónica	0,07	0,04	0,11
	Eletrodiálise	0,56	0,58	1,14
Low et al. (2008)	Frio	1,38	0,67	2,05
	Frio com sementeira de KHT	3,74	0,69	4,43
	Frio contínuo	2,60	0,66	3,26
	Eletrodiálise	3,10	1,57	4,68
Rondeau (2011)	Ácido Metatartárico	0,07	-	0,07
	CMC	0,7	-	0,7
	Manoproteínas	3,0	-	3,0

Cada método de estabilização tem os seus impactos ambientais sendo que quer os aditivos quer as resinas têm os seus impactos associados ao seu processo de produção, já que não requerem gastos significativos de água nem de energia o que faz com que seja muito difícil investigar esses mesmos impactos. Contudo, é possível quantificar esses gastos nos casos do tratamento pelo frio e da eletrodiálise. Relativamente ao consumo energético ambos os métodos revelam grandes consumos com a estabilização pelo frio a gastar cerca de 27% mais de energia do que a eletrodiálise, gastando em média 10,19 kW/h por cada 1000 litros de vinho tratado. Quanto ao consumo de água é a eletrodiálise o método que apresenta um maior consumo, gastando perto de 300% mais água (208 litros por 1000 litros de vinho tratado) do que o tratamento pelo frio.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

A estabilização tartárica do vinho pela ação do frio é o método de estabilização mais antigo e ainda o mais usado nos dias de hoje. Além da grande desvantagem do elevado custo que apresenta a estabilização pelo frio expõe o vinho a um grande risco de oxidação e fomenta a precipitação de compostos fenólicos que dão cor ao vinho. Estes efeitos adversos apesar de não serem muito graves na maioria dos vinhos podem, teoricamente, levar a uma perda de qualidade em certos vinhos, como o caso dos vinhos usados neste estudo, os Vinhos Verdes, que são vinhos destinados a serem consumidos jovens, extremamente aromáticos e por isso muito sensíveis á oxidação. Todos estes efeitos adversos da estabilização pelo frio poderão ser teoricamente evitados com o recurso à estabilização por coloides protetores, sendo que o coloide que apresenta melhores resultados é a CMC, tendo também um custo bastante baixo. No entanto apesar de já existirem artigos que comparam a estabilização pelo frio com a eletrodiálise (Santos et al., 2000) e que comparam os diferentes coloides protetores (Gerbaud et al., 2010; Guise et al., 2014), ainda não existe nenhum estudo de comparação efetiva entre a estabilização pelo frio e a estabilização por coloides protetores. Mediante este facto o principal objetivo deste trabalho é estabelecer uma comparação detalhada entre vinhos estabilizados tartaricamente pelo frio com os mesmos vinhos estabilizados com a CMC, sendo feito um estudo detalhado da sua composição química (ácido tartárico, catiões metálicos, fração fenólica, compostos de aroma e cor) e também a caracterização do perfil sensorial dos mesmos vinhos.

Apesar de todas as vantagens que o CMC apresenta em teoria, este é um composto semi-sintético e que por isso levanta ainda algumas reticências quer nos enólogos quer nos consumidores, e por isso o estudo de alternativas naturais ao CMC é visto com grande interesse. Assim, sendo o segundo objetivo deste trabalho é a prospeção de alternativas naturais ao CMC para a estabilização tartárica estudando o efeito estabilizador de vários polissacarídeos de origem natural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características dos vinhos

Os vinhos utilizados foram produzidos na Quinta D'Amares, localizada em Braga - Portugal e são classificados como DOC "Vinho Verde" sendo um vinho branco monovarietal da casta Loureiro, um vinho rosado monovarietal da casta Padeiro de Basto e um tinto de lote composto por 90% de Vinhão e 10% de Touriga Nacional. Todos os vinhos foram provenientes da vindima de 2016. O processo de vinificação do vinho branco foi caracterizado por uma fermentação a 14 °C, seguida por estágio sobre borras finas com remontagens periódicas com azoto (*battonage*), o vinho foi posteriormente colado com gelatina, PVPP e bentonite, com o objetivo de retirar os compostos fenólicos e proteicas indesejável para o estilo de vinho pretendido, sendo depois filtrado. O vinho rosado teve um processo de vinificação em que só diferiu do vinho branco no facto em que a sua fermentação foi feita a 15 °C. O vinho tinto foi fermentado em cuba rotativa a 20 °C seguindo-se a fermentação malolática completa, o vinho foi colado com gelatina, de modo a diminuir a sua adstringência pela diminuição dos taninos, e posteriormente filtrado. As características físico-químicas dos vinhos estão apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Características físico-químicas dos vinhos estudados.

Vinho	SO ₂ total (mg/L)	SO ₂ livre (mg/L)	pH	Acidez total (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Ácido málico (g/L)	Teor alcoólico (%v/v)	Açúcares redutores (g/L)	densidade
Branco	96	27	3,08	6,69	0,20	1,59	12,70	2,4	0,9885
Rosado	106	23	3,52	5,83	0,22	2,57	12,54	3,3	0,9988
Tinto	59	28	3,61	6,52	0,45	0	11,55	4,2	0,9949

3.2 Screening de alternativas naturais à CMC

Numa fase anterior ao ensaio principal foram feitos ensaios de *screening* com vários polissacarídeos de modo a avaliar o seu potencial para a estabilização tartárica de vinhos.

Foram feitos ensaios de 100 mL no vinho branco em estudo, com cinco diferentes quitosanas, quitina, alginato, ácido algínico, shellac, carragenana, gelana e agar na concentração de 100 mg/L, que ficaram em repouso a uma temperatura constante de 20 °C durante 7 dias, sendo posteriormente medida a sua estabilidade tartárica.

3.3 Ensaio de estabilização

Parte do vinho foi estabilizado tartaricamente pela ação do frio, tendo sido sujeito a uma temperatura de -4 °C durante 6 dias.

Foram realizados em duplicado ensaios de 500 mL em provetas da mesma capacidade com os aditivos CMC, ácido metatartárico e ácido algínico na concentração de 100 mg/L. Um ensaio sem aditivos foi usado como testemunha.

Os ensaios foram deixados em repouso a uma temperatura constante de 20 °C durante 7 dias antes de serem transferidos cada um para duas garrafas de 250 mL para a realização das análises químicas e análise sensorial.

3.4 Teste de minicontacto (estabilidade tartárica)

O teste de minicontacto determina a estabilidade tartárica através da medição da variação da condutividade elétrica (Δx) durante 30 minutos do vinho à temperatura constante de 0 °C em constante agitação após a adição de cristais de bitartarato de potássio (Bullio, 2002). Para esta medição foi usado o aparelho Tartar Check (Ing.C.Bullio, San Prospero, Italy). A variação da condutividade elétrica (Δx) expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$ indica o nível de estabilidade, sendo que vinhos brancos e rosados com $\Delta x < 30$ são considerados superestáveis, com $30 < \Delta x < 50$ são considerados estáveis, com $50 < \Delta x < 70$ estão em risco e com $\Delta x > 70$ são vinhos instáveis e vinhos tintos com $\Delta x < 40$ são considerados superestáveis, com $40 < \Delta x < 60$ são considerados estáveis, com $60 < \Delta x < 80$ estão em risco e com $\Delta x > 80$ são vinhos instáveis.

3.5 Quantificação de Cátions

As concentrações dos cátions potássio, cálcio, magnésio, sódio e ferro foram medidas com recurso à espectrometria de absorção atômica usando os métodos específicos para cada ião descritos pelo OIV (2017).

3.6 Ácido tartárico

A determinação da concentração de ácido tartárico foi feita através do método colorimétrico proposto por Rebelein (1969).

3.7 Compostos fenólicos totais, flavonoides e não flavonoides

Os compostos fenólicos dos vinhos foram estudados segundo o método proposto por Kramling e Singleton (1969). A determinação dos compostos fenólicos totais foi feita através da leitura da absorvância a 280nm da amostra, sendo expressa em equivalentes de ácido gálico. As leituras foram efetuadas numa cuvete de percurso ótico de 10 mm.

Para a determinação dos compostos fenólicos não flavonoides efetuou-se a precipitação com formaldeído dos flavonoides e foram efetuadas leituras da absorvância novamente a 280nm na diluição de 1/50 após repouso no escuro (72 horas para os vinhos tintos, 48 horas para os vinhos rosados e 24 horas para os vinhos brancos) e subsequente centrifugação, e a sua concentração foi expressa em equivalentes de ácido gálico. Através da diferença entre o valor de compostos fenólicos totais e dos não-flavonoides obtêm-se o valor da concentração de flavonoides no vinho. Todas as leituras são efetuadas numa cuvete de 10 mm de percurso ótico e em duplicado.

3.8 Potencial de acastanhamento

Tal como proposto por Singleton e Kramling (1976) colocaram-se 20 mL de cada amostra em dois tubos, um tubo controlo e um tubo teste. Os tubos teste foram saturados com azoto, selados e incubados a 55°C durante cinco dias.

Foram medidas absorvância das amostras numa cuvete de 10 mm de percurso ótico a 420 nm sendo que o valor do potencial de acastanhamento é dado pela diferença entre as absorvância do tubo teste e o tubo controlo.

3.9 Pigmentos totais, pigmentos poliméricos, antocianinas totais e antocianinas coradas (vinhos rosado e tinto)

As antocianinas coradas, pigmentos totais e pigmentos poliméricos foram determinados segundo o método descrito por Somers e Evans (1977).

Os parâmetros em estudo foram obtidos pelas seguintes formulas:

Antocianinas coradas= $(A_{520} \times 10 - A_{520} \text{ bissulfito} \times 10)$

Pigmentos poliméricos = $(A_{520} \text{ bissulfito} \times 10)$

Pigmentos totais = $(A_{520} \text{ HCl} \times 101)$

A determinação das antocianinas totais foi efetuada de acordo com o método proposto por Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965).

3.10 Cor e tonalidade corante

Avaliou-se a intensidade corante e a tonalidade corante dos vinhos rosados e tintos. Para tal foram medidas as absorvâncias a 420 nm para todos os vinhos e 520 e 620 para os vinhos rosados e tintos (OIV, 2017). Foi usada uma cuvete de 10 mm de percurso ótico para os vinhos rosados e uma de 1 mm para os vinhos tintos. Nos vinhos brancos foi medida a cor a 420 nm numa cuvete de 10 mm de percurso ótico (OIV, 2017). Os valores dos parâmetros estudados foram dados pelas seguintes fórmulas:

-Cor do vinho branco = Abs_{420}

-Intensidade corante do vinho rosado = $Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}$

-Intensidade corante do vinho tinto = $(Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}) * 10$

-Tonalidade corante dos vinhos rosados e tintos = Abs_{420} / Abs_{520}

3.11 Caracterização cromática

Foi avaliado o espectro de absorção das amostras num intervalo de comprimento de onda de 380 a 770nm, sendo medida a absorvância a cada 5nm. Foi usada uma cuvete de 10 mm de percurso ótico para os vinhos brancos e rosados e uma de 1 mm para os vinhos tintos. Os dados recolhidos foram usados para calcular as coordenadas cromáticas relativas ao método CIELab de acordo com o OIV (OIV, 2017). As coordenadas calculadas foram L^* (%) (luminosidade), a^* (coordenada vermelho), e b^* (coordenada amarelo). Foram determinados os valores de saturação cromática [$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$] e de angulo-tonalidade [$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$]. Foi ainda determinado o valor da diferença total de cor entre o tratamento e a testemunha [$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$].

3.12 Quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas monoméricas por HPLC

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi feita por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) (Ultimate 3000, Dionex) com um detetor de díodos (PDA100, Dionex). Foi usada uma coluna de fase reversa C-18 com 25 cm de comprimento, 4,5mm de diâmetro e partículas de 5 µm. O eluente A foi uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (v/v) e o eluente B foi metanol com qualidade para HPLC. O fluxo de eluente foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C durante a corrida, tendo sido injetado um volume de 25 µL. O esquema de eluição foi o seguinte: 5% de eluente B desde o início até o minuto 5, seguindo-se um aumento linear até chegar aos 65% de eluente B até ao minuto 65 e por fim durante os 3 minutos finais um decréscimo do eluente B novamente até aos 5%. A detecção foi feita no intervalo entre 200 e 650 nm de comprimento de onda. A metodologia usada foi a descrita por Guise et al. (2014), e a quantificação foi realizada de acordo com Filipe-Ribeiro et al. (2017).

3.13 Análise do perfil volátil por GC-MS

A identificação e semi-quantificação comparativa de compostos voláteis foi feita com recurso ao GC (cromatografia de fase gasosa) (Trace GC Ultra) e ao espectrómetro de massa como sistema de detecção (PolarisQ). O processo de extração usado foi o SPME (microextração em fase-sólida), consistindo o processo em 40 minutos a 300 rotações/min sendo que o SPME estava a 35 °C e a zona de transferência a 250 °C As injeções foram efetuadas por um injetor automático (AS 3000), tendo sido feitas injeções de 5 µL no modo *splitless* a 270°C durante 2 minutos usando um *single taper liner* de 5 mm de diâmetro. Como coluna cromatográfica foi usada a OPTIMA FFAP com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme. Como gás de arraste foi usado hélio numa taxa de fluxo de 1,5 mL/min. O programa de temperatura do forno usado foi o seguinte: 40 °C durante os primeiros 2 minutos, posteriormente subiu até aos 220 °C subindo 2 °C/min, depois subiu até aos 250 °C a 10 °C/min temperatura que foi mantida por 3 minutos, sendo assim a duração total do programa de 98 minutos.

O Espectrómetro de Massa operou em modo *full-scan* para iões positivos com uma extensão de massa de 45 a 650 sendo que a fonte de iões operou à temperatura de 220 °C.

3.14 Análise Sensorial

As amostras foram armazenadas em condições corretas de temperatura e luminosidade. A análise sensorial foi executada por um painel de provadores. Foram realizadas três sessões, uma para cada tipo de vinho, tendo sido as amostras apresentadas ao painel em copos de prova normalizados sob uma ordem aleatória marcadas com um código de três dígitos. Os vinhos Branco e Rosado foram servidos a uma temperatura de 12 °C e o vinho tinto a 18 °C. Foi usada uma escala de cinco dígitos (1 a 5) para as seguintes características avaliadas:

-Vinho Branco – Aspeto (cor e limpidez), Aroma (floral, frutado e vegetal) e Sabor (doçura, acidez, amargor, volume, equilíbrio e persistência);

-Vinho Rosado – Aspeto (cor, tonalidade e limpidez), Aroma (frutado, floral e vegetal) e Sabor (doçura, acidez, amargor, volume, equilíbrio e persistência);

-Vinho Tinto – Aspeto (cor, tonalidade e limpidez), Aroma (frutado e vegetal) e Sabor (doçura, acidez, amargor, adstringência, volume, equilíbrio e persistência);

3.15 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como médias $\pm$ o seu desvio padrão. Com exceção dos resultados das análises preliminares todos os dados físico-químicos e sensoriais obtidos foram tratados estatisticamente do mesmo modo com recurso ao software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., California, EUA).

Foi efetuada a análise da variância (ANOVA), considerando-se haver diferenças estatisticamente significativas quando p assumia valores menores que 0,05. Aos parâmetros com diferenças significativas foi efetuado o teste de comparação de médias de Tukey (TSD - Tukey Significant Difference).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* de alternativas naturais à CMC

Dos doze diferentes polissacarídeos de origem natural testados no ensaio de *screening* (cinco quitosanas diferentes, quitina, alginato, ácido algínico, shellac, carragenana, gelana e agar) observou-se que apenas o ácido algínico diminuiu significativamente a condutividade do vinho branco em estudo (Quadro 4), garantindo, assim, uma maior estabilidade tartárica ao mesmo. Assim sendo escolheu-se apenas o ácido algínico para prosseguir com os ensaios comparativos com os outros métodos de estabilização estudados.

Quadro 4 - Efeito dos diferentes polissacarídeos na estabilidade tartárica de um vinho branco.

Estabilidade tartárica	
	Δx (uS)
Testemunha	159,3
Quitosana1	154,5
Quitosana2	159,4
Quitosana3	152,1
Quitosana4	160,1
Quitosana5	150,9
Quitina	158,2
Alginato	149,4
Ácido Algínico	130,2
Shellac	157,7
Carragenana	159,8
Gelana	154,7
Agar	155,2

O ácido algínico é um co-polímero composto pelos ácidos D-manurónico e L-gulurónico unidos por uma ligação $\beta(1,4)$ (Figura 8). É extraído de forma natural das paredes celulares das algas castanhas (*Laminaria*) (Soares et al., 2004).

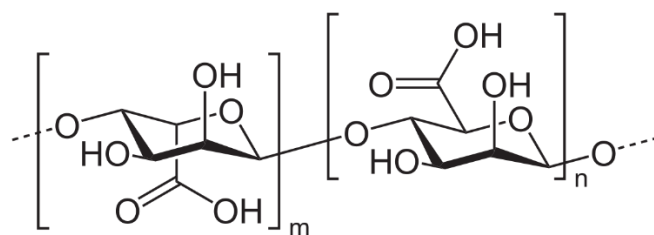


Figura 8 – Estrutura química do ácido algínico (adaptado de Boyd and Chakrabarty, 1995).

4.2 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica, teor em ácido tartárico e catiões dos vinhos

Todos os métodos de estabilização testados diminuíram significativamente o diferencial de condutividade (Δx) do vinho relativamente à amostra testemunha, ainda que o vinho tinto usado apresentasse de início um valor de Δx que o classificava como em risco de instabilidade (70,5) (Figura 9). Apenas no caso do ácido algínico em vinho branco não foi atingida a estabilidade tartárica tendo apenas diminuído 21,3 uS/cm. Este resultado poderá ser explicado pelo pKa mais elevado que o ácido algínico apresenta em comparação com a CMC. Como o vinho branco apresenta um pH considerável mais baixo que os outros vinhos (3,08 contra 3,52 e 3,61) o ácido algínico vai se encontrar na sua forma protonada e assim não ter efeito inibidor da cristalização. O ácido metatartárico foi o método de estabilização que, para os 3 vinhos estudados, garantiu o valor mais baixo do Δx seguindo-se a estabilização por frio para os vinhos tinto e branco e o CMC no caso do vinho rosado. O ácido algínico foi o método que promoveu uma menor diminuição do Δx nos casos dos vinhos brancos e tinto, mas, no entanto, conferiu uma maior estabilização do que o frio no caso do vinho rosado. Todos os resultados relativos à estabilidade tartárica encontram-se de acordo com o esperado com exceção dos relativos ao ácido algínico cujas variações de vinho para vinho possam ser devidas à sua interação com algum composto presente nos vinhos que não foi estudado ou devido às diferenças do pH das diferentes matrizes.

Observou-se, tal como esperado, uma diminuição significativa da concentração de ácido tartárico nos vinhos branco e rosado tratados pelo frio (Figura 10). Apesar de não se ter observado nenhuma diferença estatisticamente significativa no caso do vinho tinto confirma-se a tendência registada nos outros vinhos uma vez que o menor valor da concentração de ácido tartárico foi relativo ao tratamento pelo frio (Quadro 5). Este resultado indica uma perda considerável de ácido tartárico nos vinhos tratados pelo frio que poderá resultar numa modificação do perfil sensorial do vinho através de uma perda de acidez. Não se observaram diferenças significativas entre os ensaios relativos aos diferentes aditivos.

O tratamento pelo frio provocou uma diminuição estatisticamente significativa da concentração de potássio nos casos dos vinhos branco e tinto (Quadro 5). No entanto, não se observaram diferenças significativas na concentração de potássio no ensaio com vinho rosado, ainda assim foi no caso do vinho tratado pelo frio que observou o menor valor da concentração de potássio. Este é um resultado que vai de encontro às expectativas uma vez que as diferenças na concentração de potássio deverão ser proporcionais às diferenças na concentração de ácido tartárico.

Observou-se um aumento significativo da concentração de sódio nos vinhos em que foi aplicado CMC. Este resultado pode ser explicado pela transferência de sódio da CMC para o vinho já que todos as CMC apresentam quantidades de sódio na sua composição (Guise et al., 2014). Relativamente às concentrações dos restantes catiões (cálcio, magnésio e ferro) não se registaram diferenças significativas entre os ensaios nos 3 vinhos.

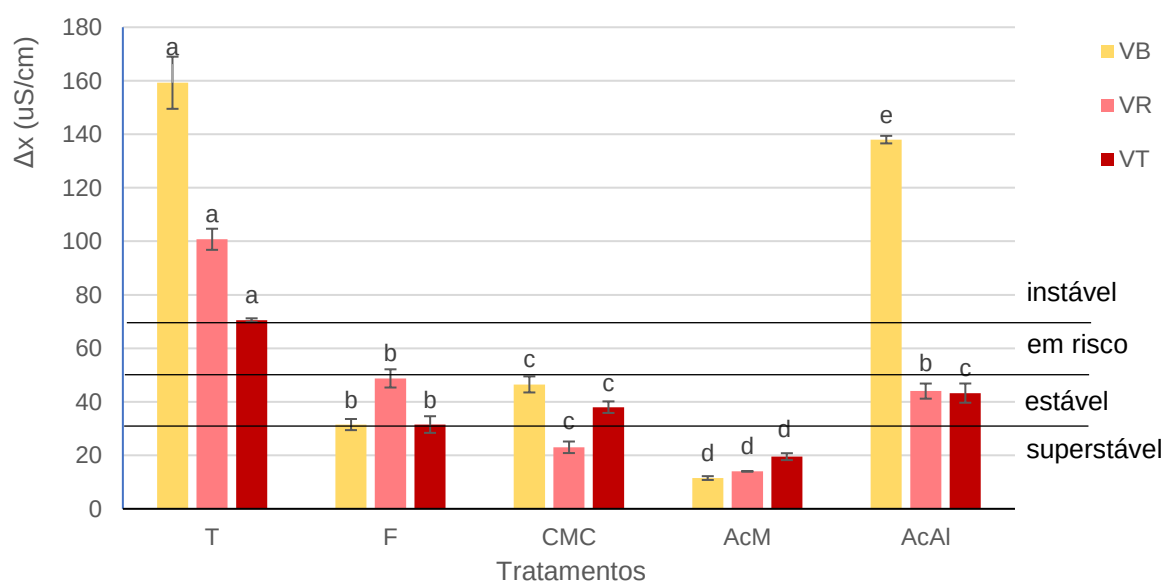


Figura 9 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica de três vinhos, um branco, um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). A variação da condutividade (Δx) expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$ indica o nível de estabilidade, $\Delta x < 30$ superestável, $30 < \Delta x < 50$ estável, $50 < \Delta x < 70$ em risco e $\Delta x > 70$ instável. Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

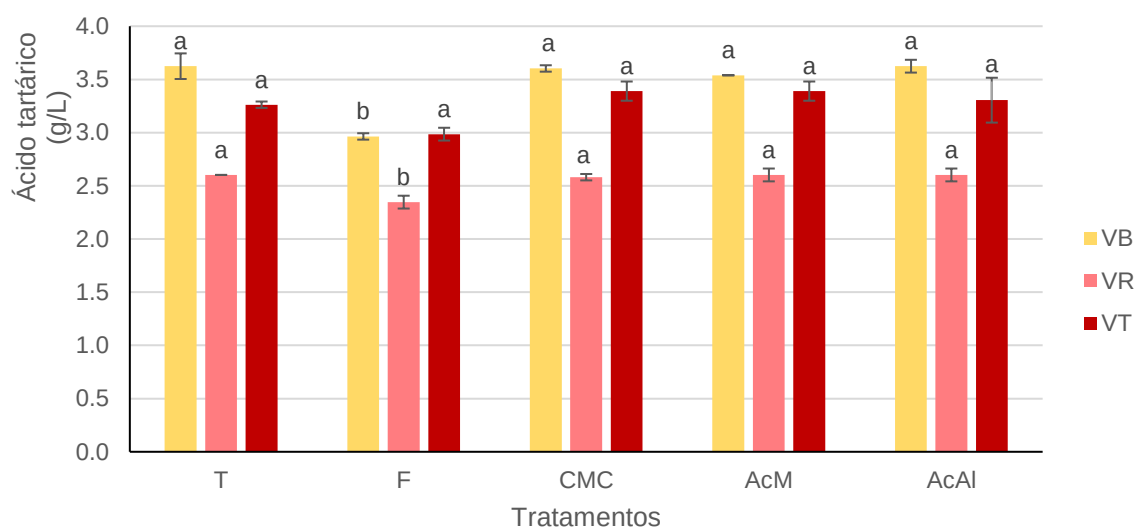


Figura 10 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração em ácido tartárico de três vinhos, um branco, um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Quadro 5- Efeito dos diferentes métodos de estabilização na estabilidade tartárica, concentração de ácido tartárico e cátions em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Ácido tartárico (g/L)	Estabilidade tartárica Δx (uS/cm)	Potássio (mg/L)	Cálcio (mg/L)	Sódio (mg/L)	Magnésio (mg/L)	Ferro (mg/L)
BT	3,62 $\pm$ 0,00 ^a	159,3 $\pm$ 9,7 ^a	763,4 $\pm$ 5,7 ^a	51,9 $\pm$ 0,3 ^a	73,7 $\pm$ 0,3 ^a	62,5 $\pm$ 0,9 ^a	0,85 $\pm$ 0,07 ^a
BF	2,96 $\pm$ 0,03 ^b	31,5 $\pm$ 2,1 ^b	551,3 $\pm$ 17,1 ^b	51,4 $\pm$ 1,0 ^a	72,2 $\pm$ 0,2 ^a	65,9 $\pm$ 2,4 ^a	0,80 $\pm$ 0,14 ^a
BCMC	3,60 $\pm$ 0,03 ^a	46,5 $\pm$ 3,0 ^c	725,1 $\pm$ 65,7 ^a	49,4 $\pm$ 1,7 ^a	84,0 $\pm$ 2,7 ^b	58,4 $\pm$ 2,6 ^a	0,80 $\pm$ 0,00 ^a
BACM	3,54 $\pm$ 0,00 ^a	11,5 $\pm$ 0,7 ^d	680,5 $\pm$ 2,7 ^a	52,1 $\pm$ 0,7 ^a	73,0 $\pm$ 1,0 ^a	61,0 $\pm$ 0,1 ^a	0,95 $\pm$ 0,07 ^a
BACAI	3,62 $\pm$ 0,06 ^a	138,0 $\pm$ 1,4 ^f	777,7 $\pm$ 5,8 ^a	49,9 $\pm$ 0,3 ^a	74,6 $\pm$ 0,0 ^a	62,8 $\pm$ 2,7 ^a	0,90 $\pm$ 0,14 ^a
RT	2,60 $\pm$ 0,00 ^a	100,8 $\pm$ 3,9 ^a	1031,1 $\pm$ 18,2 ^a	43,2 $\pm$ 2,6 ^a	77,6 $\pm$ 0,2 ^a	68,5 $\pm$ 7,2 ^a	1,20 $\pm$ 0,07 ^a
RF	2,35 $\pm$ 0,06 ^b	48,8 $\pm$ 3,4 ^b	934,4 $\pm$ 22,6 ^a	45,7 $\pm$ 2,6 ^a	74,6 $\pm$ 0,4 ^a	70,4 $\pm$ 4,5 ^a	1,00 $\pm$ 0,07 ^a
RCMC	2,58 $\pm$ 0,03 ^a	23,0 $\pm$ 2,2 ^c	1016,9 $\pm$ 34,8 ^a	43,7 $\pm$ 1,6 ^a	81,6 $\pm$ 3,7 ^b	71,6 $\pm$ 4,2 ^a	1,10 $\pm$ 0,04 ^a
RACM	2,60 $\pm$ 0,06 ^a	14,0 $\pm$ 0,0 ^d	943,4 $\pm$ 7,3 ^a	42,7 $\pm$ 0,7 ^a	72,1 $\pm$ 1,8 ^a	69,9 $\pm$ 1,1 ^a	1,30 $\pm$ 0,14 ^a
RACAI	2,60 $\pm$ 0,06 ^a	44,0 $\pm$ 2,8 ^b	1050,0 $\pm$ 9,2 ^a	42,7 $\pm$ 0,3 ^a	73,7 $\pm$ 1,0 ^a	69,7 $\pm$ 1,7 ^a	1,10 $\pm$ 0,07 ^a
TT	3,26 $\pm$ 0,03 ^a	70,5 $\pm$ 0,7 ^a	1328,6 $\pm$ 68,1 ^a	71,8 $\pm$ 4,9 ^a	58,1 $\pm$ 0,1 ^a	118,2 $\pm$ 13,4 ^a	0,95 $\pm$ 0,07 ^a
TF	2,98 $\pm$ 0,06 ^a	31,5 $\pm$ 3,1 ^b	1204,1 $\pm$ 30,6 ^b	68,4 $\pm$ 4,2 ^a	61,2 $\pm$ 0,7 ^a	110,1 $\pm$ 6,6 ^a	0,80 $\pm$ 0,00 ^a
TCMC	3,39 $\pm$ 0,09 ^a	38,0 $\pm$ 2,2 ^c	1385,0 $\pm$ 3,9 ^{a,c}	67,9 $\pm$ 1,4 ^a	70,1 $\pm$ 4,7 ^b	112,5 $\pm$ 5,8 ^a	0,75 $\pm$ 0,07 ^a
TACM	3,39 $\pm$ 0,09 ^a	19,5 $\pm$ 1,3 ^d	1431,8 $\pm$ 11,8 ^{a,d}	68,9 $\pm$ 0,7 ^a	58,2 $\pm$ 2,6 ^a	119,8 $\pm$ 2,0 ^a	0,95 $\pm$ 0,21 ^a
TACAI	3,31 $\pm$ 0,21 ^a	43,3 $\pm$ 3,6 ^c	1211,7 $\pm$ 12,7 ^{a,b}	69,1 $\pm$ 0,3 ^a	57,6 $\pm$ 2,0 ^a	112,0 $\pm$ 0,7 ^a	0,90 $\pm$ 0,00 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartrático (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAl), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

4.3 Efeito dos diferentes métodos de estabilização tartárica na composição fenólica, características cromáticas e potencial de acastanhamento dos vinhos

Os resultados mostram que o tratamento pelo frio provocou uma redução da concentração de compostos fenólicos nos vinhos rosado e tinto relativamente aos vinhos não estabilizados e estabilizados com aditivos enológicos, não se tendo verificado essa condição no caso do vinho branco (Quadro 7). Este resultado poderá ser explicado pela franca menor concentração em compostos fenólicos que o vinho branco apresenta relativamente aos outros dois vinhos utilizados, o que poderá resultar com que possíveis diferenças não sejam notadas. Observou-se que esta diferença entre concentrações de polifenóis se deve apenas ao decréscimo da concentração de flavonoides uma vez que se registou uma diminuição significativa dos mesmos nos vinhos rosado e tinto sujeitos ao tratamento pelo frio, ao passo que não se registaram diferenças no caso dos não flavonoides. Este resultado sugere que apenas a fração dos flavonoides será sensível ao abaixamento da temperatura durante a estabilização tartárica por frio.

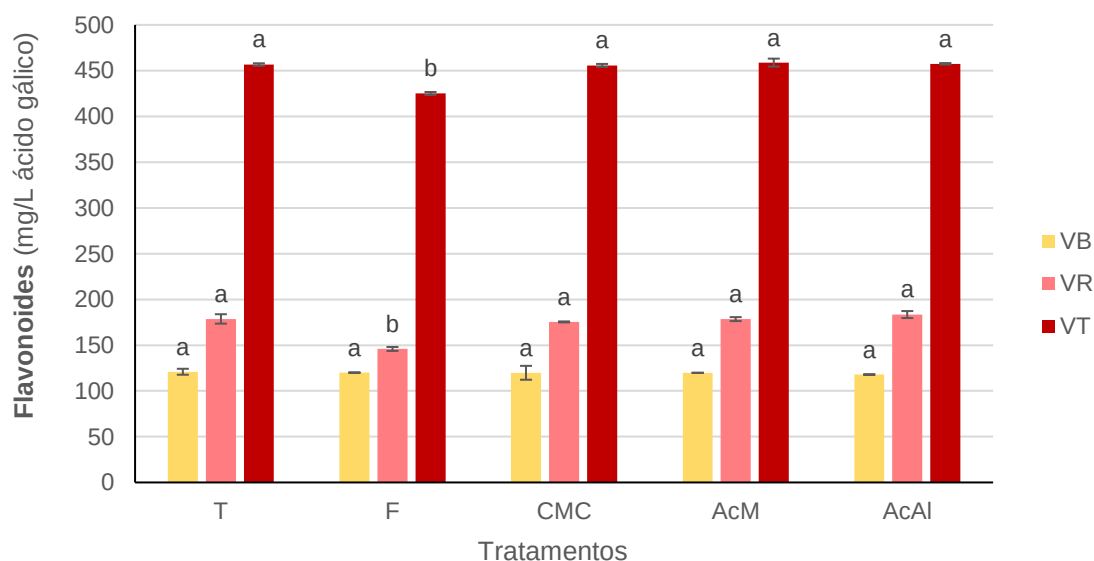


Figura 11 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração em flavonoides em três vinhos, um branco, um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

A análise espectrofotométrica dos componentes corados nos vinhos rosado e tinto revelou uma diminuição significativa da concentração de antocianinas coradas nos vinhos quando tratados

através do frio relativamente aos restantes tratamentos e testemunhas. O mesmo resultado foi observado no caso da concentração de pigmentos poliméricos (Figura 12). Apesar destes resultados não foram observadas diferenças significativas para ambos os vinhos nos casos das concentrações de antocianinas totais e de pigmentos totais (Quadro 7). No entanto, apesar de não serem estatisticamente significativas, observaram-se ligeiras diminuições das concentrações de antocianinas totais nos vinhos rosado e tinto tratados pelo frio e de pigmentos totais no vinho tinto.

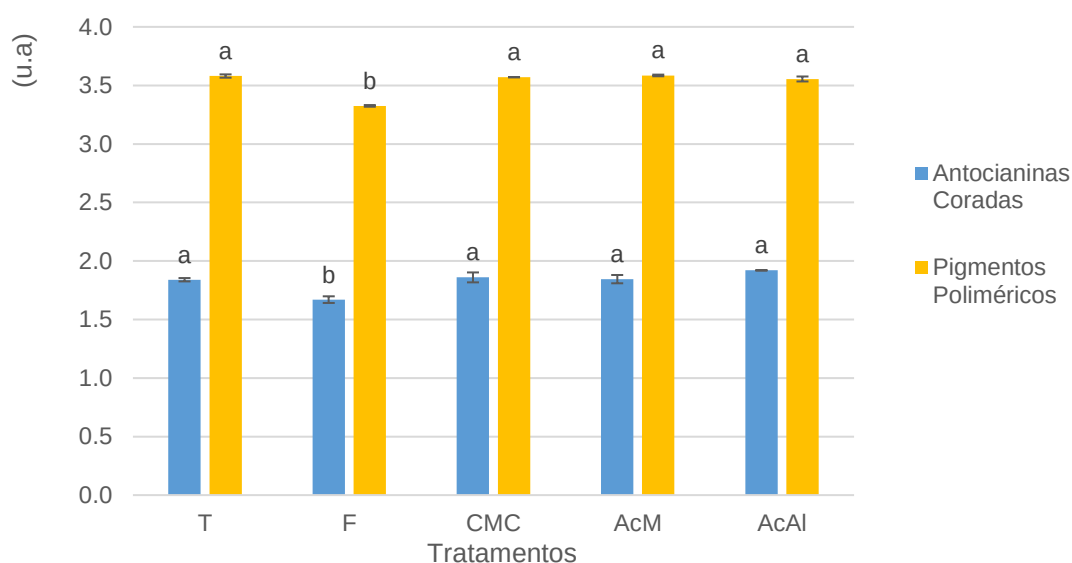


Figura 12 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração em antocianinas coradas e pigmentos poliméricos num vinho tinto (média $\pm$ desvio padrão),

Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Observou-se que nenhum tratamento causou diferenças significativas no potencial de acastanhamento do vinho branco o que indica que não houve alterações significativas nas concentrações dos compostos fenólicos suscetíveis ao fenómeno de acastanhamento. Da mesma forma, não se registaram diferenças significativas na cor do vinho branco (Quadro 6), O que significa que nenhum dos tratamentos provocou uma diminuição significativa dos compostos responsáveis pela sua cor.

Quadro 6 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na cor e no potencial de acastanhamento no vinho branco (média $\pm$ desvio padrão).

	Cor UA	Potencial de acastanhamento UA
BT	0,011 $\pm$ 0,001 ^a	0,0020 $\pm$ 0,0014 ^a
BF	0,011 $\pm$ 0,003 ^a	0,0025 $\pm$ 0,0021 ^a
BCMC	0,012 $\pm$ 0,001 ^a	0,0015 $\pm$ 0,0007 ^a
BACM	0,009 $\pm$ 0,000 ^a	0,0020 $\pm$ 0,0014 ^a
BACAI	0,016 $\pm$ 0,003 ^a	0,0025 $\pm$ 0,0021 ^a

Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tardado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAI), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Relativamente às características cromáticas dos vinhos estudados observou-se que os diferentes tratamentos de estabilização tartárica tiveram uma grande influência na cor dos vinhos rosado e tinto e induziu alterações mínimas na cor do vinho branco estudado (Quadro 8). Observou-se uma diminuição considerável da intensidade corante nos vinhos rosado e tinto que foram sujeitos a tratamento pelo frio sendo que se observou também uma ligeira diminuição da intensidade corante no vinho tinto tratado com ácido algínico (Figura 13). A tonalidade corante, analisada nos vinhos rosado e tinto, não registou qualquer alteração significativa para qualquer dos tratamentos. Relativamente à análise das coordenadas CIELab observou-se que todos os tratamentos de estabilização tartárica (com exceção do ácido metatartárico no vinho tinto) induziram um aumento de luminosidade (L^*) relativamente à testemunha nos vinhos tinto e rosado sendo esse aumento significativamente maior para a estabilização a frio relativamente aos restantes tratamentos. O parâmetro luminosidade está relacionado com a limpidez, sendo diretamente proporcionais. Nos vinhos brancos não se observaram diferenças significativas neste parâmetro. Na coordenada a^* , relativa à cor vermelho, obtiveram-se resultados contraditórios, uma vez que nos vinhos branco e rosado observou-se uma diminuição significativa deste parâmetro nos vinhos tratados pelo frio, mas no caso do vinho tinto o resultado foi inverso, observando-se um aumento significativo deste parâmetro no vinho tratado pelo frio. Este resultado poderá indicar a existência de quantidades vestigiais de antocianinas no vinho branco provenientes de um fenómeno de *pinking*. Observou-se uma pequena diminuição da coordenada b^* , relativa à cor amarela, no vinho branco tratado com ácido algínico, não se observaram diferenças neste parâmetro no vinho rosado e registou-se uma grande diminuição deste valor de b^* no caso do vinho tinto tratado pelo frio. A aplicação de ácido algínico causou uma diminuição significativa da saturação cromática (C^*) no vinho branco ao passo que no vinho rosado foi registada uma redução semelhante neste parâmetro no vinho tratado pelo frio. No caso do vinho tinto apesar de se

terem verificado diferenças estatisticamente significativas para este parâmetro estas parecem ser um pouco aleatórias e por isso inconclusivas. Observaram-se diferenças significativas no valor do parâmetro $^{\circ}h$, relativo à tonalidade, dos três vinhos quando tratados pelo frio relativamente tanto à testemunha como aos restantes tratamentos. Este valor é mais elevado que os restantes nos casos dos vinhos branco e rosado e inferior aos restantes no caso do vinho tinto. Estes são correspondentes com a diminuição da coordenada vermelho (a^*) nos vinhos branco e rosado e da coordenada amarelo (b^*) no vinho tinto abordadas anteriormente. O parâmetro ΔE^* , que é relativo à diferença total de cor entre o tratamento e a testemunha sendo que se tal diferença for igual ou superior a dois valores representa uma diferença detetável pelo olho humano (Spagna et al., 1996). Nos vinhos rosado e tinto registaram-se diferenças significativas no valor de ΔE^* dos respetivos vinhos tratados pelo frio relativamente aos restantes tratamentos, sendo estes valores muito superiores aos restantes e também superiores ao limiar de deteção visual de dois valores. No caso do vinho branco também se observa um valor deste parâmetro muito superior no caso do tratamento pelo frio, não apresentando, no entanto, qualquer diferença estatisticamente significativa, sendo também muito inferior ao limiar de deteção visual. Os resultados relativos aos parâmetros cromáticos dos vinhos indicam uma grande probabilidade de a estabilização tartárica pelo frio ter um grande impacto na cor dos vinhos especialmente nos vinhos que contêm antocianinas, sendo que nestes casos estas diferenças serão, teoricamente, facilmente detetáveis pelo olho humano. Estes resultados indicam ainda uma possível interação entre o ácido algínico e os compostos corados do vinho, uma vez que se observaram também abaixamentos dos valores, ainda que não estatisticamente significativos nos parâmetros intensidade da cor e antocianinas totais nos vinhos rosado e tinto tratados com este polissacarídeo.

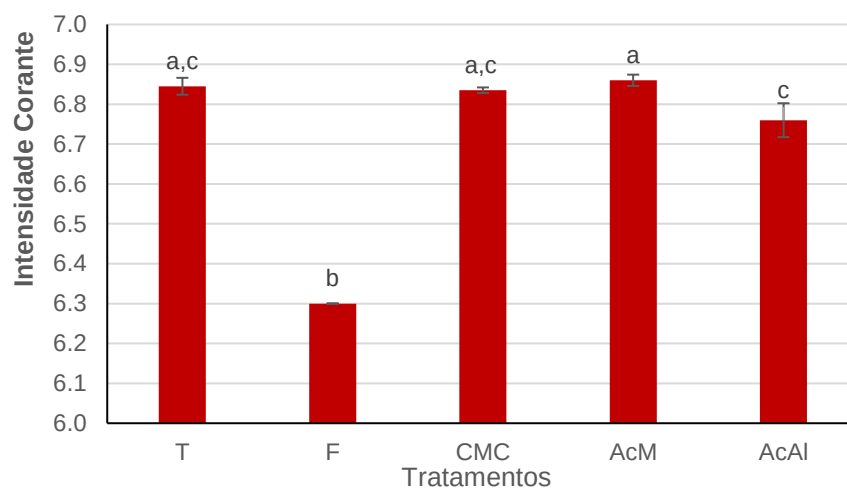


Figura 13 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na intensidade corante de um vinho tinto (média $\pm$ desvio padrão).

Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Quadro 7 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição fenólica em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Compostos		Flavonoides		Antocianinas totais		Pigmentos		Pigmentos totais (u.a)
	fenólicos totais (mg/L ácido gálico)	Não flavonoides (mg/L ácido gálico)	(mg/L ácido gálico)	(mg/L) gálico	coradas (u.a)	poliméricos (u.a)			
BT	178,8 $\pm$ 0,0 ^a	57,9 $\pm$ 3,3 ^a	121,0 $\pm$ 3,3 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
BF	177,3 $\pm$ 2,2 ^a	57,3 $\pm$ 2,4 ^a	120,0 $\pm$ 0,3 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
BCMC	178,8 $\pm$ 4,3 ^a	59,0 $\pm$ 3,3 ^a	119,8 $\pm$ 7,6 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
BACM	178,8 $\pm$ 0,0 ^a	59,0 $\pm$ 0,0 ^a	119,8 $\pm$ 0,0 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
BACAI	175,8 $\pm$ 0,0 ^a	57,9 $\pm$ 0,0 ^a	117,9 $\pm$ 0,0 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
RT	237,1 $\pm$ 4,3 ^a	58,4 $\pm$ 0,8 ^a	178,7 $\pm$ 5,2 ^a	11,8 $\pm$ 0,6 ^a	0,067 $\pm$ 0,001 ^a	0,050 $\pm$ 0,000 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a
RF	204,9 $\pm$ 2,2 ^b	59,0 $\pm$ 0,0 ^a	145,9 $\pm$ 2,2 ^b	9,2 $\pm$ 0,6 ^a	0,038 $\pm$ 0,007 ^b	0,035 $\pm$ 0,007 ^b	0,61 $\pm$ 0,00 ^a	0,61 $\pm$ 0,00 ^a	0,61 $\pm$ 0,00 ^a
RCMC	235,6 $\pm$ 2,2 ^a	60,2 $\pm$ 1,6 ^a	175,4 $\pm$ 0,5 ^a	10,9 $\pm$ 0,6 ^a	0,061 $\pm$ 0,006 ^a	0,055 $\pm$ 0,007 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a
RACM	238,7 $\pm$ 2,2 ^a	60,2 $\pm$ 0,0 ^a	178,5 $\pm$ 2,2 ^a	11,4 $\pm$ 0,0 ^a	0,066 $\pm$ 0,002 ^a	0,050 $\pm$ 0,000 ^a	0,61 $\pm$ 0,00 ^a	0,61 $\pm$ 0,00 ^a	0,61 $\pm$ 0,00 ^a
RACAI	244,8 $\pm$ 2,2 ^a	61,3 $\pm$ 1,6 ^a	183,5 $\pm$ 3,8 ^a	11,8 $\pm$ 1,9 ^a	0,060 $\pm$ 0,006 ^a	0,055 $\pm$ 0,007 ^a	0,71 $\pm$ 0,00 ^a	0,71 $\pm$ 0,00 ^a	0,71 $\pm$ 0,00 ^a
TT	530,1 $\pm$ 2,2 ^a	73,4 $\pm$ 0,8 ^a	456,7 $\pm$ 1,4 ^a	386,1 $\pm$ 7,7 ^a	1,840 $\pm$ 0,014 ^a	3,580 $\pm$ 0,014 ^a	15,20 $\pm$ 1,21 ^a	15,20 $\pm$ 1,21 ^a	15,20 $\pm$ 1,21 ^a
TF	497,9 $\pm$ 0,0 ^b	72,8 $\pm$ 1,6 ^a	425,0 $\pm$ 1,6 ^b	374,1 $\pm$ 3,1 ^a	1,670 $\pm$ 0,028 ^b	3,325 $\pm$ 0,007 ^b	13,84 $\pm$ 0,00 ^a	13,84 $\pm$ 0,00 ^a	13,84 $\pm$ 0,00 ^a
TCMC	528,5 $\pm$ 0,0 ^a	72,8 $\pm$ 1,6 ^a	455,7 $\pm$ 1,6 ^a	381,7 $\pm$ 4,6 ^a	1,860 $\pm$ 0,042 ^a	3,570 $\pm$ 0,000 ^a	14,40 $\pm$ 0,50 ^a	14,40 $\pm$ 0,50 ^a	14,40 $\pm$ 0,50 ^a
TACM	531,6 $\pm$ 4,3 ^a	72,8 $\pm$ 0,0 ^a	458,8 $\pm$ 4,3 ^a	381,7 $\pm$ 1,9 ^a	1,845 $\pm$ 0,035 ^a	3,585 $\pm$ 0,007 ^a	15,71 $\pm$ 0,21 ^a	15,71 $\pm$ 0,21 ^a	15,71 $\pm$ 0,21 ^a
TACAI	528,5 $\pm$ 0,0 ^a	71,1 $\pm$ 0,8 ^a	457,4 $\pm$ 0,8 ^a	366,4 $\pm$ 5,6 ^a	1,920 $\pm$ 0,000 ^a	3,555 $\pm$ 0,021 ^a	14,80 $\pm$ 0,36 ^a	14,80 $\pm$ 0,36 ^a	14,80 $\pm$ 0,36 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tardado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAI), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%). u.a. – unidades de absorvância; na – não analisado.

Quadro 8 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização nas características cromáticas em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Intensidade corante	Tonalidade corante	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE^*
BT	n.a.	n.a.	98,7 $\pm$ 0,05 ^a	0,23 $\pm$ 0,00 ^a	4,62 $\pm$ 0,05 ^a	4,62 $\pm$ 0,05 ^a	1,52 $\pm$ 0,00 ^a	-
BF	n.a.	n.a.	98,9 $\pm$ 0,02 ^a	0,02 $\pm$ 0,00 ^b	4,67 $\pm$ 0,04 ^a	4,67 $\pm$ 0,04 ^a	1,57 $\pm$ 0,00 ^b	0,34 $\pm$ 0,02 ^a
BCMC	n.a.	n.a.	98,7 $\pm$ 0,03 ^a	0,24 $\pm$ 0,02 ^a	4,63 $\pm$ 0,03 ^a	4,64 $\pm$ 0,03 ^a	1,52 $\pm$ 0,00 ^a	0,09 $\pm$ 0,01 ^a
BACM	n.a.	n.a.	98,7 $\pm$ 0,10 ^a	0,21 $\pm$ 0,00 ^a	4,60 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	4,61 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	1,53 $\pm$ 0,00 ^a	0,11 $\pm$ 0,10 ^a
BACAI	n.a.	n.a.	98,8 $\pm$ 0,09 ^a	0,27 $\pm$ 0,04 ^a	4,47 $\pm$ 0,03 ^b	4,48 $\pm$ 0,03 ^b	1,51 $\pm$ 0,01 ^a	0,19 $\pm$ 0,14 ^a
RT	0,220 $\pm$ 0,007 ^a	0,802 $\pm$ 0,050 ^a	89,1 $\pm$ 2,45 ^{a,c}	17,58 $\pm$ 0,01 ^a	5,94 $\pm$ 0,27 ^a	18,56 $\pm$ 0,08 ^a	0,33 $\pm$ 0,01 ^a	-
RF	0,132 $\pm$ 0,001 ^b	0,753 $\pm$ 0,000 ^a	94,5 $\pm$ 0,10 ^{b,c}	8,67 $\pm$ 0,08 ^b	6,12 $\pm$ 0,04 ^a	10,61 $\pm$ 0,09 ^b	0,62 $\pm$ 0,00 ^b	10,55 $\pm$ 1,39 ^a
RCMC	0,215 $\pm$ 0,001 ^a	0,775 $\pm$ 0,001 ^a	90,0 $\pm$ 1,27 ^c	17,28 $\pm$ 0,07 ^a	6,14 $\pm$ 0,20 ^a	18,34 $\pm$ 0,13 ^a	0,34 $\pm$ 0,01 ^a	1,06 $\pm$ 1,06 ^b
RACM	0,224 $\pm$ 0,009 ^a	0,857 $\pm$ 0,033 ^a	90,9 $\pm$ 0,21 ^c	18,12 $\pm$ 0,33 ^a	6,25 $\pm$ 0,02 ^a	19,17 $\pm$ 0,30 ^a	0,33 $\pm$ 0,01 ^a	1,95 $\pm$ 2,18 ^b
RACAI	0,216 $\pm$ 0,001 ^a	0,799 $\pm$ 0,011 ^a	90,5 $\pm$ 0,30 ^c	17,67 $\pm$ 0,13 ^a	6,55 $\pm$ 0,06 ^a	18,84 $\pm$ 0,11 ^a	0,36 $\pm$ 0,01 ^a	1,75 $\pm$ 1,81 ^b
TT	6,85 $\pm$ 0,02 ^{a,c}	0,792 $\pm$ 0,001 ^a	55,7 $\pm$ 0,16 ^a	57,63 $\pm$ 0,01 ^a	5,70 $\pm$ 0,30 ^a	57,91 $\pm$ 0,04 ^a	0,10 $\pm$ 0,01 ^a	-
TF	6,30 $\pm$ 0,00 ^b	0,792 $\pm$ 0,004 ^a	59,4 $\pm$ 0,02 ^b	58,63 $\pm$ 0,08 ^b	1,16 $\pm$ 0,05 ^b	58,64 $\pm$ 0,08 ^b	0,02 $\pm$ 0,00 ^b	5,96 $\pm$ 0,36 ^a
TCMC	6,84 $\pm$ 0,01 ^{a,c}	0,791 $\pm$ 0,002 ^a	56,1 $\pm$ 0,08 ^{a,c}	57,18 $\pm$ 0,03 ^c	5,11 $\pm$ 0,02 ^c	57,41 $\pm$ 0,03 ^c	0,09 $\pm$ 0,00 ^a	0,88 $\pm$ 0,22 ^b
TACM	6,86 $\pm$ 0,01 ^a	0,792 $\pm$ 0,002 ^a	55,9 $\pm$ 0,12 ^a	57,91 $\pm$ 0,10 ^d	5,92 $\pm$ 0,00 ^a	58,21 $\pm$ 0,10 ^a	0,10 $\pm$ 0,00 ^a	0,45 $\pm$ 0,19 ^b
TACAI	6,76 $\pm$ 0,04 ^c	0,783 $\pm$ 0,003 ^a	56,5 $\pm$ 0,11 ^c	57,60 $\pm$ 0,05 ^a	5,60 $\pm$ 0,14 ^{a,c}	57,28 $\pm$ 0,18 ^c	0,10 $\pm$ 0,01 ^a	0,10 $\pm$ 0,00 ^b

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (TT), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatártico (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (ACAI), L* - luminosidade, a* - coordenada vermelho, b* - coordenada amarelo, h° - tom, ΔE^* - diferença de cor relativamente ao ensaio testemunha. Os valores de ΔE^* foram obtidos tendo como referência o respetivo vinho testemunha (T), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%); n.a. não analisado

4.4 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na composição polifenólica – Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides dos vinhos

Foram identificados e quantificados nove ácidos fenólicos nos vinhos branco e rosado e oito no vinho tinto (Quadro 9), sendo que não se registaram quaisquer diferenças estatísticas entre os tratamentos e as testemunhas dos respectivos vinhos. Este resultado está em concordância com o resultado da análise espectrométrica da composição polifenólica referida no Quadro 6 uma vez que também não se observaram diferenças significativas na fração dos não flavonoides dos vinhos, indicando, estes resultados, que os tratamentos de estabilização tartárica não terão qualquer interação com esta classe de compostos.

No caso do vinho branco apenas foi estudado um flavonoide, a catequina (Quadro 9), já que os vinhos brancos, na sua maioria, não apresentam antocianinas na sua composição (Andrea-Silva et al., 2014). Não foram observadas diferenças significativas na concentração de catequina entre as diferentes amostras de vinho branco, estando este resultado, mais uma vez, em concordância com o resultado da análise espectrométrica da composição polifenólica visto que também não se observaram diferenças significativas na fração dos flavonoides do vinho branco. Este resultado também confirma a ausência de diferenças significativas no estudo do potencial de acastanhamento uma vez que são as catequinas o composto que mais tem influência neste fenómeno que afeta os vinhos brancos. No caso dos vinhos rosado e tinto o resultado relativo às catequinas apresentou valores significativamente mais baixos nos vinhos sujeitos ao tratamento pelo frio relativamente às respetivas testemunhas e restantes tratamentos, estando este resultado em concordância com o resultado da análise espectrométrica da composição polifenólica anteriormente referida já que se observou a mesma diminuição da concentração da fração dos flavonoides para os mesmos vinhos quando tratados pelo frio (Figura 14). O facto de serem observados resultados contraditórios entre o vinho branco e os vinhos rosado e tinto deverá dever-se a fenómenos de co-pigmentação nos quais as catequinas, entre outros compostos fenólicos de baixo peso molecular, se ligam a antocianinas monoméricas (Miniati et al., 1992) existentes em concentrações significativas em vinhos provenientes de uvas tintas.

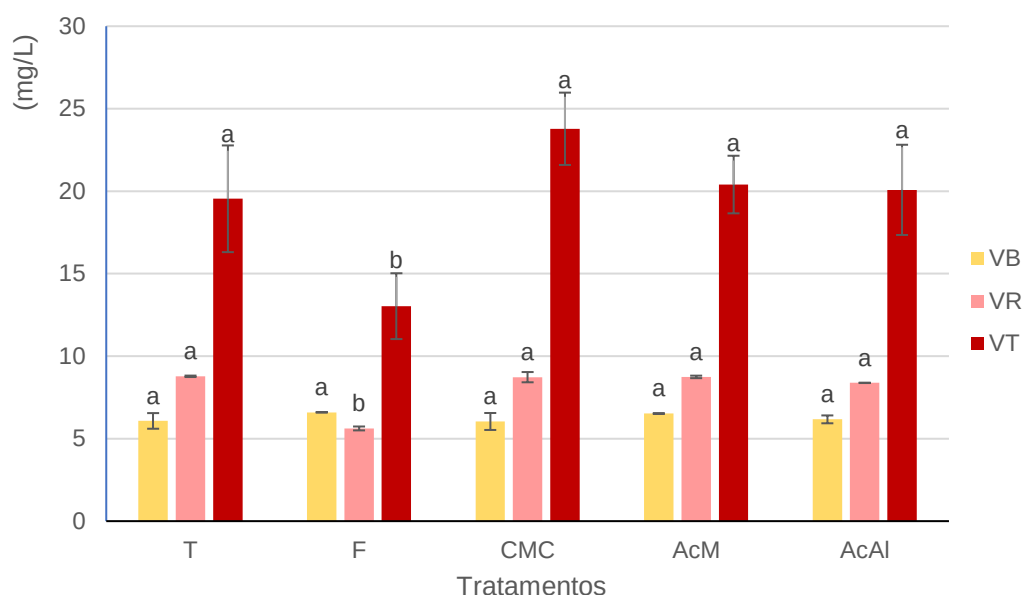


Figura 14 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de catequina em três vinhos, um branco, um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Foram identificadas e quantificadas dez diferentes antocianinas no vinho rosado e doze no vinho tinto (Quadros 10.1 e 10.2) com recurso à cromatografia líquida de alta performance. Observou-se em cinco destas antocianinas no vinho rosado que a sua concentração é significativamente inferior no vinho tratados pelo frio relativamente à testemunha e restantes tratamentos, sendo estas a cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3-acetilglicosídeo e malvidina-3-coumarilglicosídeo. O mesmo resultado foi observado para seis das antocianinas identificadas no vinho tinto, sendo estas a cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, petunidina-3-acetilglicosídeo e petunidina-3-coumarilglicosídeo. Foram observadas diferenças significativas entre as testemunhas e tratamentos e entre os tratamentos nos casos da delfinidina-3-glicosídeo e da delfinidina-3-acetilglicosídeo no vinho rosado e da peonidina-3-acetilglicosídeo no vinho tinto, no entanto em todos estes três casos a concentração de antocianina mais baixa foi sempre a da amostra tratada pelo frio. Nos restantes casos onde não foram observadas diferenças estatisticamente significativas observou-se que, no entanto, a concentração da respetiva antocianina foi sistematicamente mais baixa na amostra que sofreu estabilização pelo frio. Este conjunto de resultados está em concordância com os

resultados da análise espectrofotométrica dos componentes corados e das características cromáticas anteriormente referidos, uma vez que todas estas análises verificam quer uma diminuição da intensidade da cor quer uma diminuição da concentração das antocianinas nos vinhos rosado e tinto estabilizados tartaricamente pelo frio, que são os compostos responsáveis pela coloração dos mesmos. Pensa-se que, por isso, que o tratamento pelo frio causará uma perda de cor nos vinhos tintos e rosados pela diminuição da sua concentração em antocianinas através da sua precipitação.

Observou-se que na grande maioria das antocianinas quantificadas para ambos os vinhos rosado e tinto o segundo menor valor (sendo o primeiro o correspondente ao tratamento pelo frio) foi o relativo à amostra tratada com ácido algínico. No entanto esta diferença apenas se revelou estatisticamente significativa no caso da petunidina-3-coumarilglicosídeo. Estes resultados reforçam a suspeita anteriormente referida de que o ácido algínico interage com os compostos corados dos vinhos rosados e tintos, estabelecendo, provavelmente, interações iónicas com as antocianinas, formando complexos que precipitam.

Foi ainda calculada a concentração total em antocianinas monoméricas (Quadro 10.2) através do somatório das concentrações individuais de cada antocianina monomérica. Estes resultados vêm confirmar o referido anteriormente na medida em que se observou uma diminuição estatisticamente significativa dos valores de concentração total em antocianinas em ambos os vinhos para as amostras tratadas com frio relativamente aos restantes tratamentos e respetivas testemunhas. Observou-se também uma diminuição de quase 10% na concentração total em antocianinas no vinho tinto tratado com o ácido algínico (Figura 15). Esta diferença, à semelhança do que se passou com as concentrações individuais das diferentes antocianinas não se revelou estatisticamente significativa. Estes valores são discordantes com os obtidos através do método de Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965) anteriormente referidos. No entanto, são os resultados obtidos por HPLC os que se consideram mais corretos visto que a diminuição significativa dos valores de concentração total em antocianinas em ambos os vinhos para as amostras tratadas com frio está em concordância com os valores de intensidade corante obtidos, algo que não se verifica nos resultados obtidos através do método de Ribéreau-Gayon e Stonestreet. Além disso o HPLC é um método reconhecidamente mais exato que os restantes.

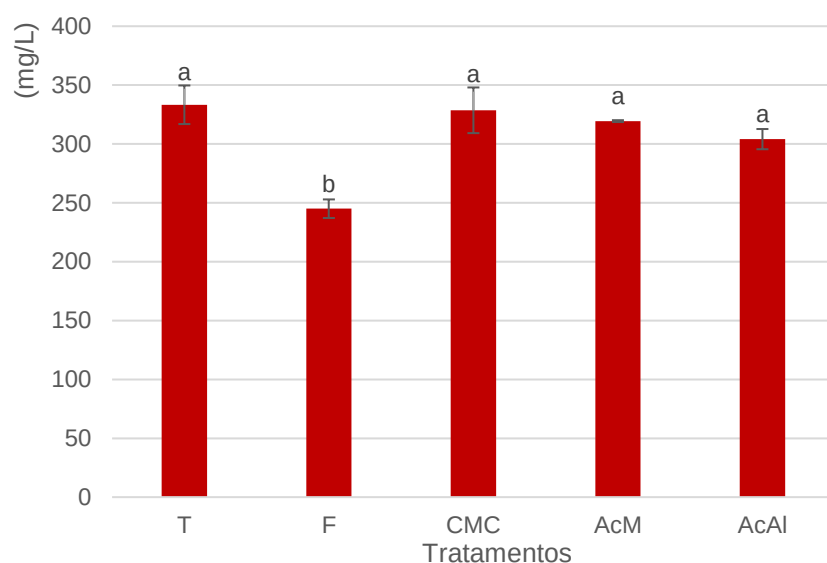


Figura 15 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração total em antocianinas de um vinho tinto (média $\pm$ desvio padrão) Vinho testemunha (T),

Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Os resultados obtidos contrariam a contrarrecomendação do uso de CMC em vinhos tintos e rosados com matéria corante instável de Davaux et al. (2013), visto que este interagirá com as frações de compostos fenólicos, formando agregados intermoleculares insolúveis (Moutounet et al., 2010). No entanto não se observaram quaisquer diferenças significativas quer nas características cromáticas quer na concentração de compostos fenólicos nos vinhos rosado e tinto estudados que foram tratados com CMC, o que segundo Claus et al. (2014) e Sommer et al. (2016) indicará que ambos os vinhos não apresentavam instabilidade proteica.

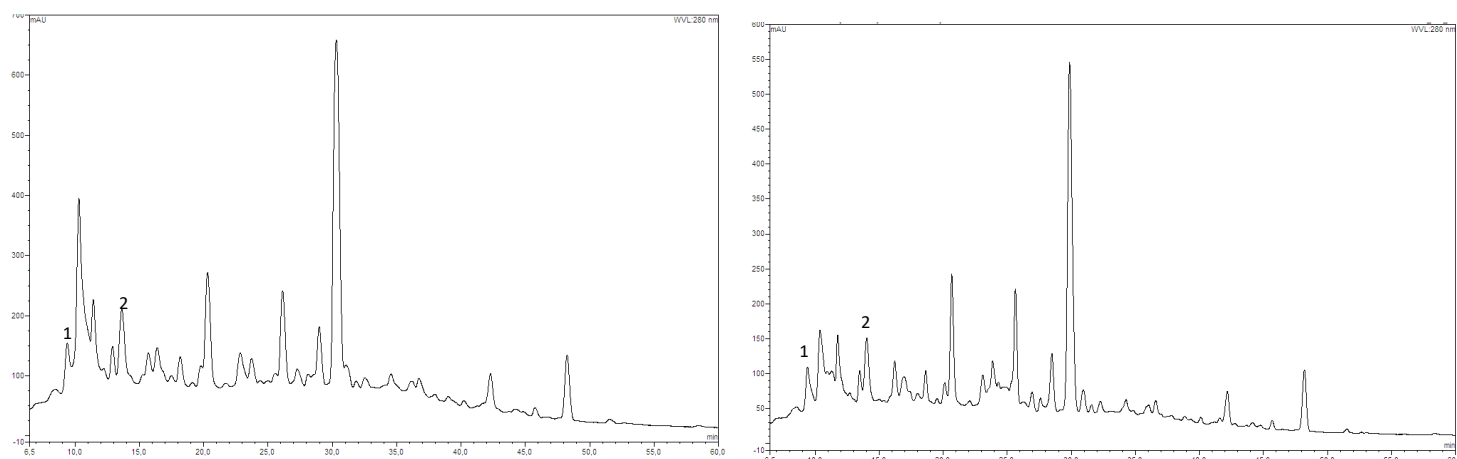


Figura 16 – Cromatogramas a 280nm relativos ao vinho tinto testemunha (esquerda) e ao vinho tinto tratado por frio (direita). 1- ácido gálico, 2 – catequina.

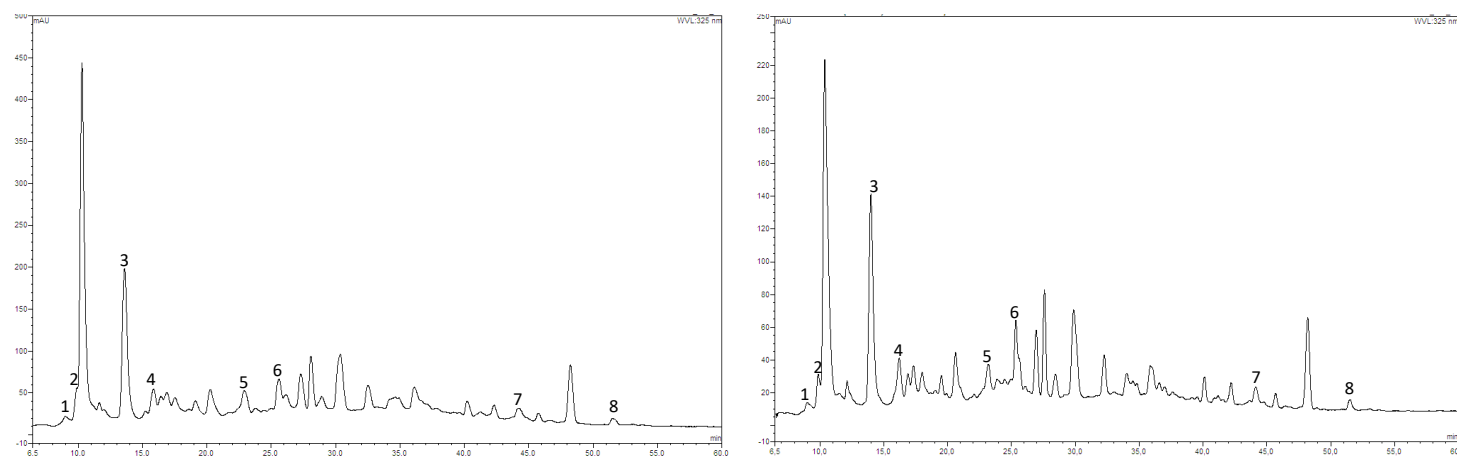


Figura 17 – Cromatogramas a 325nm relativos ao vinho tinto testemunha (esquerda) e ao vinho tinto tratado por frio (direita). 1 - ácido *trans*-cafetárico, 2 – ácido 2-S-glutationilcafetárico, 3 - ácido coutárico, 4 – ácido cafeico, 5 - ácido 4-hidroxicinamico, 6 - ácido ferúlico, 7 - ácido etilcafeico, 8 - ácido etilcoumárico.

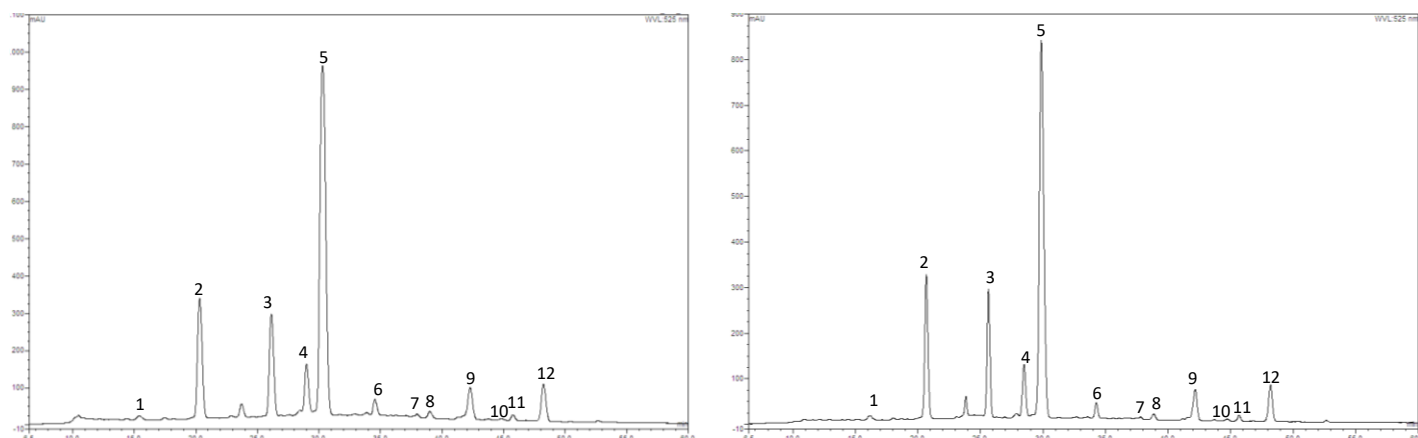


Figura 18 – Cromatogramas a 525nm relativos ao vinho tinto testemunha (esquerda) e ao vinho tinto tratado por frio (direita). 1 - delphinidina-3-glicosídeo, 2 - cianidina-3-glicosídeo, 3 - petunidina-3-glicosídeo, 4 - peonidina-3-glicosídeo, 5 - malvidina-3-glicosídeo, 6 - delphinidina-3-acetilglicosídeo, 7 - petunidina-3-acetilglicosídeo, 8 - peonidina-3-acetilglicosídeo, 9 - malvidina-3-acetilglicosídeo, 10 - cianidina-3-coumarilglicosídeo, 11 - petunidina-3-coumarilglicosídeo, 12 - malvidina-3-coumarilglicosídeo.

Quadro 9 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de catequina e de ácidos fenólicos (em mg/L) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Ácido Gálico	Catequina	Ácido trans-cafetárico	GRP	Ácido Coutárico	Ácido Cafeico	Ácido 4-hidroxicinâmico	Ácido Ferúlico	Ácido Etilcafeico	Ácido Etilcoumárico
BT	0,19 $\pm$ 0,00 ^a	6,08 $\pm$ 0,47 ^a	4,55 $\pm$ 0,28 ^a	0,09 $\pm$ 0,00 ^a	0,48 $\pm$ 0,03 ^a	1,14 $\pm$ 0,06 ^a	0,35 $\pm$ 0,05 ^a	0,41 $\pm$ 0,02 ^a	0,51 $\pm$ 0,00 ^a	0,10 $\pm$ 0,01 ^a
BF	0,19 $\pm$ 0,00 ^a	6,60 $\pm$ 0,00 ^a	4,49 $\pm$ 0,01 ^a	0,06 $\pm$ 0,01 ^a	0,49 $\pm$ 0,04 ^a	1,15 $\pm$ 0,05 ^a	0,40 $\pm$ 0,03 ^a	0,42 $\pm$ 0,04 ^a	0,56 $\pm$ 0,05 ^a	0,12 $\pm$ 0,03 ^a
BCMC	0,20 $\pm$ 0,02 ^a	6,04 $\pm$ 0,51 ^a	4,73 $\pm$ 0,03 ^a	0,06 $\pm$ 0,01 ^a	0,55 $\pm$ 0,01 ^a	1,23 $\pm$ 0,04 ^a	0,38 $\pm$ 0,02 ^a	0,44 $\pm$ 0,05 ^a	0,53 $\pm$ 0,02 ^a	0,11 $\pm$ 0,01 ^a
BACM	0,20 $\pm$ 0,00 ^a	6,52 $\pm$ 0,01 ^a	5,01 $\pm$ 0,39 ^a	0,07 $\pm$ 0,02 ^a	0,59 $\pm$ 0,05 ^a	1,19 $\pm$ 0,05 ^a	0,36 $\pm$ 0,01 ^a	0,43 $\pm$ 0,02 ^a	0,53 $\pm$ 0,02 ^a	0,11 $\pm$ 0,00 ^a
BACAI	0,20 $\pm$ 0,01 ^a	6,17 $\pm$ 0,24 ^a	5,05 $\pm$ 0,26 ^a	0,06 $\pm$ 0,01 ^a	0,59 $\pm$ 0,05 ^a	1,20 $\pm$ 0,00 ^a	0,36 $\pm$ 0,01 ^a	0,42 $\pm$ 0,00 ^a	0,53 $\pm$ 0,01 ^a	0,11 $\pm$ 0,00 ^a
RT	0,30 $\pm$ 0,01 ^a	8,78 $\pm$ 0,04 ^a	2,32 $\pm$ 0,19 ^a	0,16 $\pm$ 0,04 ^a	0,58 $\pm$ 0,05 ^a	1,56 $\pm$ 0,08 ^a	0,48 $\pm$ 0,11 ^a	0,46 $\pm$ 0,01 ^a	0,53 $\pm$ 0,01 ^a	0,20 $\pm$ 0,01 ^a
RF	0,28 $\pm$ 0,00 ^a	5,62 $\pm$ 0,12 ^b	2,05 $\pm$ 0,30 ^a	0,16 $\pm$ 0,00 ^a	0,65 $\pm$ 0,04 ^a	1,61 $\pm$ 0,00 ^a	0,50 $\pm$ 0,14 ^a	0,47 $\pm$ 0,03 ^a	0,42 $\pm$ 0,07 ^a	0,21 $\pm$ 0,04 ^a
RCMC	0,29 $\pm$ 0,00 ^a	8,73 $\pm$ 0,31 ^a	2,66 $\pm$ 0,03 ^a	0,15 $\pm$ 0,02 ^a	0,63 $\pm$ 0,06 ^a	1,47 $\pm$ 0,03 ^a	0,51 $\pm$ 0,05 ^a	0,45 $\pm$ 0,02 ^a	0,44 $\pm$ 0,06 ^a	0,21 $\pm$ 0,06 ^a
RACM	0,29 $\pm$ 0,01 ^a	8,74 $\pm$ 0,08 ^a	2,29 $\pm$ 0,24 ^a	0,16 $\pm$ 0,01 ^a	0,58 $\pm$ 0,15 ^a	1,57 $\pm$ 0,07 ^a	0,50 $\pm$ 0,06 ^a	0,44 $\pm$ 0,01 ^a	0,47 $\pm$ 0,08 ^a	0,19 $\pm$ 0,02 ^a
RACAI	0,29 $\pm$ 0,00 ^a	8,38 $\pm$ 0,01 ^a	2,24 $\pm$ 0,34 ^a	0,17 $\pm$ 0,02 ^a	0,64 $\pm$ 0,03 ^a	1,61 $\pm$ 0,04 ^a	0,51 $\pm$ 0,07 ^a	0,46 $\pm$ 0,00 ^a	0,48 $\pm$ 0,03 ^a	0,23 $\pm$ 0,02 ^a
TT	4,59 $\pm$ 0,81 ^a	19,54 $\pm$ 3,23 ^a	17,30 $\pm$ 2,22 ^a	0,73 $\pm$ 0,34 ^a	4,73 $\pm$ 0,98 ^a	n.d.	0,73 $\pm$ 0,12 ^a	3,99 $\pm$ 0,25 ^a	2,04 $\pm$ 0,12 ^a	0,32 $\pm$ 0,21 ^a
TF	4,58 $\pm$ 0,48 ^a	13,03 $\pm$ 2,00 ^b	19,20 $\pm$ 0,12 ^a	0,41 $\pm$ 0,27 ^a	4,91 $\pm$ 0,58 ^a	n.d.	0,90 $\pm$ 0,04 ^a	4,21 $\pm$ 0,60 ^a	1,91 $\pm$ 0,37 ^a	0,24 $\pm$ 0,06 ^a
TCMC	5,95 $\pm$ 1,12 ^a	23,78 $\pm$ 2,19 ^a	19,41 $\pm$ 2,25 ^a	0,27 $\pm$ 0,05 ^a	5,94 $\pm$ 0,23 ^a	n.d.	0,85 $\pm$ 0,27 ^a	4,32 $\pm$ 0,09 ^a	1,63 $\pm$ 0,05 ^a	0,36 $\pm$ 0,14 ^a
TACM	5,55 $\pm$ 0,39 ^a	20,40 $\pm$ 1,75 ^a	17,54 $\pm$ 3,53 ^a	0,67 $\pm$ 0,48 ^a	5,42 $\pm$ 0,85 ^a	n.d.	0,84 $\pm$ 0,05 ^a	4,31 $\pm$ 0,54 ^a	1,73 $\pm$ 0,32 ^a	0,33 $\pm$ 0,15 ^a
TACAI	5,77 $\pm$ 2,17 ^a	20,08 $\pm$ 2,73 ^a	20,34 $\pm$ 0,36 ^a	0,65 $\pm$ 0,50 ^a	5,38 $\pm$ 0,80 ^a	n.d.	0,81 $\pm$ 0,18 ^a	4,55 $\pm$ 0,25 ^a	1,47 $\pm$ 0,15 ^a	0,35 $\pm$ 0,16 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatártico (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAl), GRP - ácido 2-S-glutationilcafetárico, os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%) n.d. não detectado.

Quadros 10.1 e 10.2 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de antocianinas monoméricas e antocianinas monoméricas totais (em mg/L) em dois vinhos um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Del-3-Glc	Cya-3-Glc	Pet-3-Glc	Peo-3-Glc	Mal-3-Glc	Del-3-AcGlc	Cya-3-AcGlc	Del-3-CoGlc
RT	0,027 $\pm$ 0,001 ^{a,b,c}	0,145 $\pm$ 0,011 ^a	0,263 $\pm$ 0,012 ^a	0,198 $\pm$ 0,022 ^a	1,668 $\pm$ 0,134 ^a	0,0194 $\pm$ 0,0010 ^{a,b,c}	n.d.	n.d.
RF	0,022 $\pm$ 0,001 ^b	0,087 $\pm$ 0,007 ^b	0,185 $\pm$ 0,013 ^b	0,162 $\pm$ 0,027 ^a	1,211 $\pm$ 0,013 ^b	0,0156 $\pm$ 0,0012 ^b	n.d.	n.d.
RCMC	0,029 $\pm$ 0,001 ^c	0,134 $\pm$ 0,014 ^a	0,303 $\pm$ 0,019 ^a	0,190 $\pm$ 0,009 ^a	1,521 $\pm$ 0,035 ^a	0,0183 $\pm$ 0,0003 ^{a,b,c}	n.d.	n.d.
RAcM	0,027 $\pm$ 0,002 ^{a,b,c}	0,141 $\pm$ 0,005 ^a	0,278 $\pm$ 0,013 ^a	0,182 $\pm$ 0,000 ^a	1,567 $\pm$ 0,027 ^a	0,0210 $\pm$ 0,0014 ^c	n.d.	n.d.
RAcAI	0,029 $\pm$ 0,001 ^c	0,127 $\pm$ 0,004 ^a	0,298 $\pm$ 0,026 ^a	0,180 $\pm$ 0,005 ^a	1,532 $\pm$ 0,052 ^a	0,0188 $\pm$ 0,0004 ^{a,b,c}	n.d.	n.d.
TT	2,16 $\pm$ 0,26 ^a	50,86 $\pm$ 3,15 ^a	50,72 $\pm$ 2,00 ^a	36,03 $\pm$ 1,54 ^a	154,16 $\pm$ 8,18 ^a	5,49 $\pm$ 0,01 ^a	n.d.	n.d.
TF	1,62 $\pm$ 0,21 ^a	37,21 $\pm$ 0,86 ^b	33,98 $\pm$ 1,89 ^b	25,17 $\pm$ 0,36 ^b	114,58 $\pm$ 4,26 ^b	4,42 $\pm$ 0,43 ^a	n.d.	n.d.
TCMC	2,42 $\pm$ 0,67 ^a	51,69 $\pm$ 3,14 ^a	49,70 $\pm$ 3,43 ^a	33,51 $\pm$ 3,47 ^a	151,53 $\pm$ 5,86 ^a	5,61 $\pm$ 0,47 ^a	n.d.	n.d.
TAcM	2,16 $\pm$ 0,11 ^a	48,89 $\pm$ 0,21 ^a	47,94 $\pm$ 1,89 ^a	34,59 $\pm$ 1,42 ^a	147,36 $\pm$ 3,01 ^a	5,30 $\pm$ 0,38 ^a	n.d.	n.d.
TAcAI	1,96 $\pm$ 0,06 ^a	46,00 $\pm$ 1,61 ^a	46,77 $\pm$ 2,14 ^a	33,87 $\pm$ 0,58 ^a	138,84 $\pm$ 5,14 ^a	5,29 $\pm$ 0,07 ^a	n.d.	n.d.

	Pet-3-AcGlc	Peo-3-AcGlc	Mal-3-AcGlc	Cya-3-CoGlc	Pet-3-CoGlc	Peo-3-CoGlc	Mal-3-CoGlc	Antocianinas T.
RT	0,0549 $\pm$ 0,0082 ^a	0,073 $\pm$ 0,009 ^a	0,166 $\pm$ 0,010 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	0,075 $\pm$ 0,001 ^a	2,69 $\pm$ 0,15 ^a
RF	0,0459 $\pm$ 0,0008 ^a	0,044 $\pm$ 0,019 ^a	0,127 $\pm$ 0,009 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	0,057 $\pm$ 0,001 ^b	1,96 $\pm$ 0,08 ^b
RCMC	0,0568 $\pm$ 0,0067 ^a	0,061 $\pm$ 0,003 ^a	0,164 $\pm$ 0,005 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	0,070 $\pm$ 0,007 ^a	2,55 $\pm$ 0,04 ^a
RAcM	0,0559 $\pm$ 0,0001 ^a	0,072 $\pm$ 0,003 ^a	0,156 $\pm$ 0,005 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	0,073 $\pm$ 0,002 ^a	2,57 $\pm$ 0,04 ^a
RAcAI	0,0547 $\pm$ 0,0021 ^a	0,063 $\pm$ 0,001 ^a	0,158 $\pm$ 0,004 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	0,068 $\pm$ 0,005 ^a	2,53 $\pm$ 0,03 ^a
TT	1,65 $\pm$ 0,05 ^a	5,10 $\pm$ 0,16 ^{a,b,c}	11,70 $\pm$ 0,46 ^a	0,71 $\pm$ 0,25 ^a	2,43 $\pm$ 0,07 ^a	n.d.	12,35 $\pm$ 0,48 ^a	333,3 $\pm$ 16,4 ^a
TF	0,94 $\pm$ 0,15 ^b	4,29 $\pm$ 0,11 ^b	9,34 $\pm$ 0,83 ^a	0,67 $\pm$ 0,05 ^a	1,92 $\pm$ 0,12 ^b	n.d.	10,87 $\pm$ 1,16 ^a	245,0 $\pm$ 7,90 ^b
TCMC	1,73 $\pm$ 0,06 ^a	5,43 $\pm$ 0,34 ^c	11,29 $\pm$ 1,31 ^a	0,80 $\pm$ 0,25 ^a	2,59 $\pm$ 0,17 ^a	n.d.	12,32 $\pm$ 0,25 ^a	328,6 $\pm$ 19,4 ^a
TAcM	1,67 $\pm$ 0,26 ^a	5,09 $\pm$ 0,29 ^{a,b,c}	11,06 $\pm$ 0,47 ^a	0,73 $\pm$ 0,02 ^a	2,50 $\pm$ 0,16 ^a	n.d.	12,09 $\pm$ 0,21 ^a	319,4 $\pm$ 0,79 ^a
TAcAI	1,77 $\pm$ 0,08 ^a	5,00 $\pm$ 0,12 ^{a,b,c}	9,48 $\pm$ 1,17 ^a	0,78 $\pm$ 0,14 ^a	2,35 $\pm$ 0,08 ^{a,b}	n.d.	11,98 $\pm$ 0,55 ^a	304,1 $\pm$ 8,59 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAI), Del-3-Glc - Delfinidina-3-glicosídeo, Cya-3-Glc - Cianidina-3-glicosídeo, Pet-3-Glc - Petunidina-3-glicosídeo, Peo-3-Glc - Peonidina-3-glicosídeo, Mal-3-Glc - Malvidina-3-glicosídeo, Del-3-AcGlc - Delfinidina-3-acetilglicosídeo, Cya-3-AcGlc - Cianidina-3-acetilglicosídeo, Del-3-CoGlc - Delfinidina-3-coumarilglicosídeo, Pet-3-CoGlc - Petunidina-3-coumarilglicosídeo, Peo-3-CoGlc - Peonidina-3-coumarilglicosídeo, Mal-3-CoGlc - Malvidina-3-coumarilglicosídeo, Cya-3-CoGlc - Cianidina-3-coumarilglicosídeo, Pet-3-CoGlc - Petunidina-3-coumarilglicosídeo, Mal-3-CoGlc - Malvidina-3-coumarilglicosídeo, Antocianinas T. - Antocianinas Totais, os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

4.5 Efeito dos diferentes métodos de estabilização no perfil de aromas dos vinhos - Identificação e quantificação de compostos de aroma

A análise por cromatografia gasosa revelou de uma maneira geral poucas diferenças entre a abundância relativa de compostos de aroma nos vinhos sujeitos aos diferentes tratamentos de estabilização tartárica (Quadros 11.1 e 11.2). Não se observaram diferenças no vinho tinto e apenas diferenças na concentração de um dos 8 compostos identificados no caso do vinho rosado. Foi entre os vinhos brancos que se observaram um maior número de diferenças significativas, o que poderá ser explicado pelo facto de este vinho ser proveniente de uvas da casta Loureiro, casta classificada como aromática (Araújo et al., 2003) e daí serem mais significativas as diferenças provocadas pelos diferentes tratamentos na fração de aroma dos vinhos.

Foram observadas diminuições estatisticamente significativas no vinho branco sujeito ao tratamento pelo frio relativamente quer ao vinho testemunha quer aos outros tratamentos do álcool isoamílico e 2-feniletanol que conferem (principalmente) aromas de banana e rosas respetivamente (Meilgaard, 1975). Este resultado relativo ao 2-feniletanol foi também observado no caso do vinho rosado (Figura 19). Esta perda de compostos de aroma pelo tratamento do vinho pelo frio poderá ter como causa um de dois fenómenos. Estes compostos poderão ser oxidados já que o abaixamento da temperatura resulta numa maior solubilidade do oxigénio no vinho e consequentemente o torna mais vulnerável a fenómenos de oxidação. Por outro lado, estes compostos podem se encontrar em parte associados com outros compostos que precipitam com o abaixamento da temperatura arrastando-as moléculas, existindo também a possibilidade dos compostos de aroma (por serem compostos de baixo peso molecular) ficarem fisicamente retidos na estrutura cristalina dos cristais dos tartaratos num fenómeno que é denominado por oclusão. Por outro lado, observou-se, também apenas no vinho branco, um grande aumento da concentração dos ésteres caproato de etilo (Figura 20) e de decanoato de etilo no vinho sujeito ao tratamento pelo frio em relação quer à testemunha quer aos restantes tratamentos. Estes compostos são descritos como tendo um aroma frutado que lembra o ananás e a maçã respetivamente (Meilgaard, 1975). Estes resultados poderão ser explicados pela diminuição da concentração de vários dos outros compostos voláteis no espaço de cabeça provocada pelo tratamento pelo frio. Esta diminuição fará com que o caproato de etilo e o decanoato, ao manterem as suas concentrações, tenham menor concorrência pela adsorção à fibra de microextração e assim apresentem picos de maior área do que nos restantes ensaios e controlo.

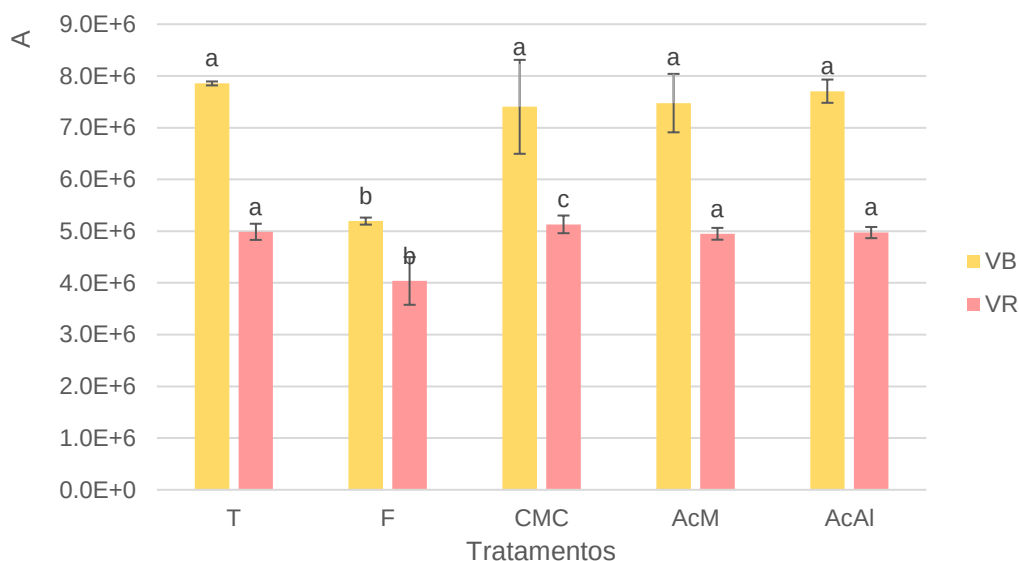


Figura 19 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de 2-feniletanol (expressa pela área dos picos cromatográficos) em dois vinhos, um branco e um rosado (média $\pm$ desvio padrão). Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

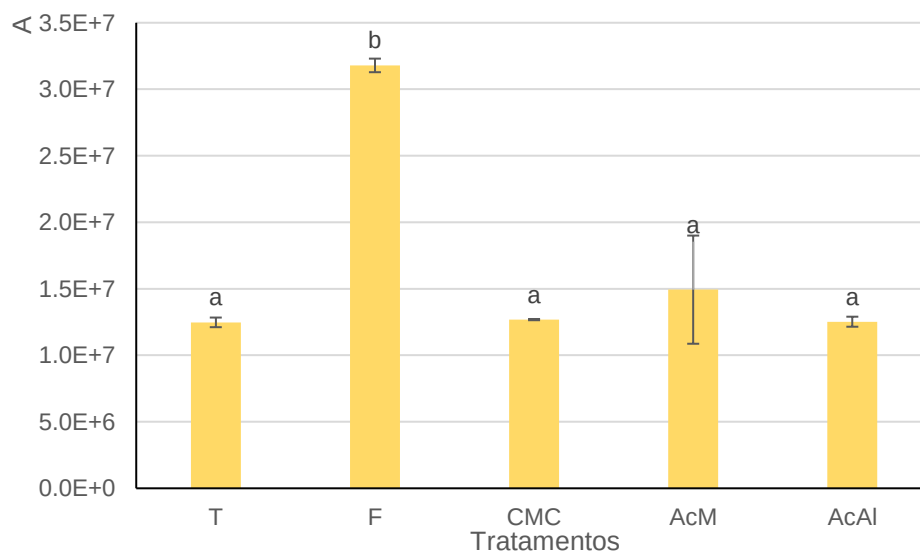


Figura 20 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de caproato de etilo (expressa pela área dos picos cromatográficos) num vinho branco (média $\pm$ desvio padrão). Vinho branco (VB), Vinho rosado (VR), Vinho tinto (VT), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl). Os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

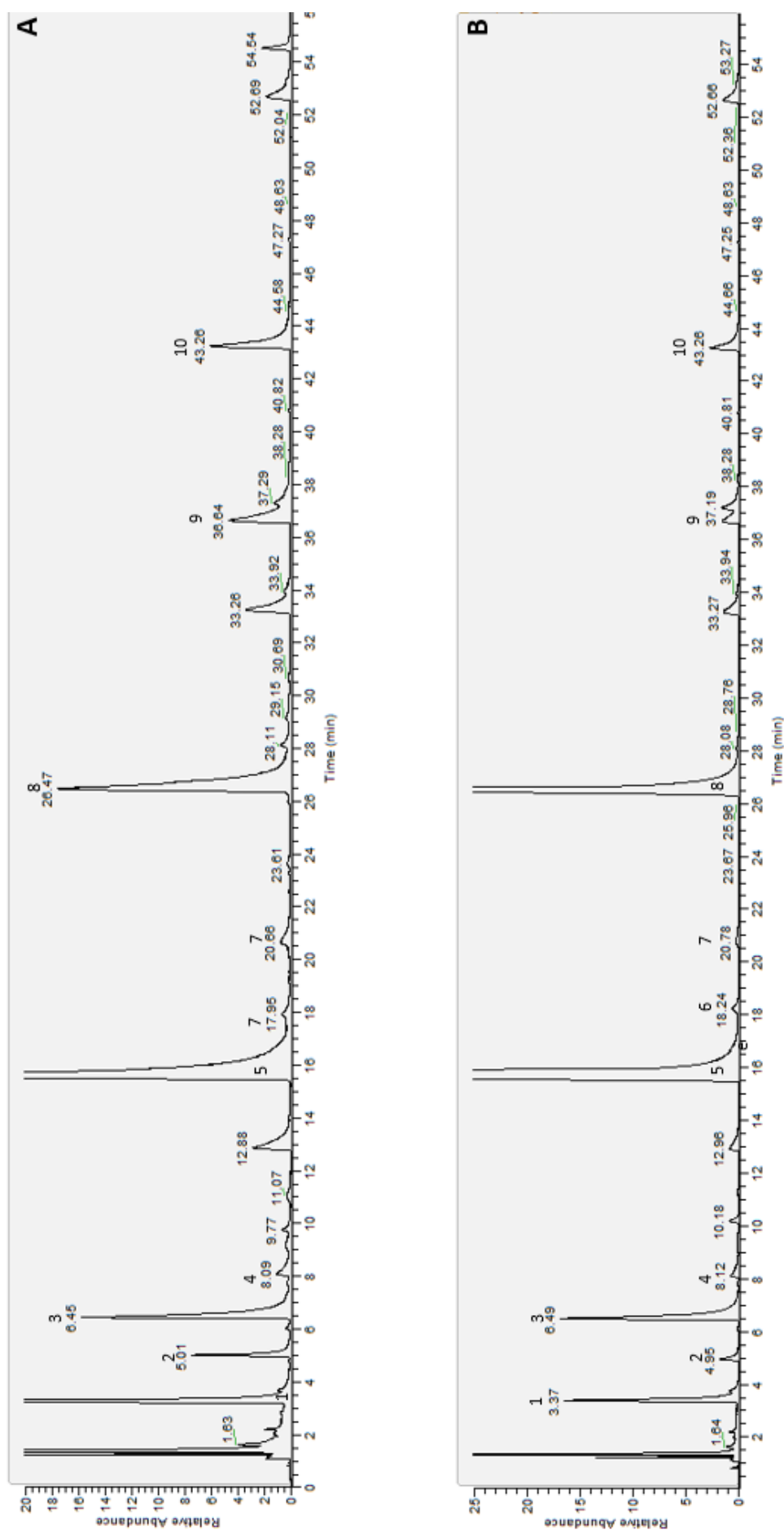


Figura 21 – Cromatogramas de cromatografia de fase gasosa relativos ao vinho branco testemunha (A) e ao vinho branco tratado pelo frio (B). 1 - Acetato de isoamilo, 2 - Álcool isoamílico, 3 - Caproato de etilo, 4 - 1-hexanol, 5 - Octanoato de etilo, 6 - Ácido isobutírico, 7 - Linalol, 8 - Decanoato de etilo, 9 - 2-feniletanol, 10 - Ácido octanóico.

Quadro 11.1- Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de compostos de aroma (expressos pela área dos picos cromatográficos) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Acetato de isoamilo	Álcool isoamílico	Caproato de etilo	1-hexanol	Octanoato de etilo
BT	2,31E+7 $\pm$ 6,03E+5 ^a	3,77E+6 $\pm$ 9,45E+4 ^a	1,25E+7 $\pm$ 3,62E+5 ^b	1,34E+6 $\pm$ 1,58E+5 ^a	7,31E+7 $\pm$ 1,39E+6 ^a
BF	2,04E+7 $\pm$ 4,19E+5 ^a	2,49E+6 $\pm$ 1,56E+5 ^b	3,18E+7 $\pm$ 5,11E+5 ^c	1,71E+6 $\pm$ 6,14E+4 ^a	7,91E+7 $\pm$ 4,87E+6 ^a
BCMC	2,19E+7 $\pm$ 1,93E+6 ^a	3,67E+6 $\pm$ 1,56E+5 ^a	1,27E+7 $\pm$ 4,59E+4 ^a	2,14E+6 $\pm$ 3,11E+4 ^a	8,44E+7 $\pm$ 2,86E+6 ^a
BACM	2,25E+7 $\pm$ 1,39E+6 ^a	3,73E+6 $\pm$ 3,87E+5 ^a	1,49E+7 $\pm$ 4,07E+6 ^a	1,80E+6 $\pm$ 3,95E+5 ^a	8,46E+7 $\pm$ 4,73E+4 ^a
BACAI	2,25E+7 $\pm$ 1,39E+6 ^a	3,71E+6 $\pm$ 7,77E+4 ^a	1,25E+7 $\pm$ 3,77E+5 ^a	1,47E+6 $\pm$ 6,85E+4 ^a	7,65E+7 $\pm$ 4,18E+6 ^a
RT	4,63E+7 $\pm$ 8,58E+5 ^a	4,96E+6 $\pm$ 1,93E+5 ^a	1,31E+7 $\pm$ 2,70E+5 ^a	1,53E+6 $\pm$ 2,24E+5 ^a	2,54E+8 $\pm$ 4,38E+7 ^a
RF	4,92E+7 $\pm$ 1,17E+6 ^a	4,21E+6 $\pm$ 3,73E+5 ^a	1,30E+7 $\pm$ 8,54E+4 ^a	1,72E+6 $\pm$ 5,13E+5 ^a	2,96E+8 $\pm$ 3,35E+7 ^a
RCMC	4,56E+7 $\pm$ 8,73E+5 ^a	4,97E+6 $\pm$ 3,73E+5 ^a	1,31E+7 $\pm$ 4,79E+4 ^a	2,10E+6 $\pm$ 5,39E+5 ^a	2,35E+8 $\pm$ 1,50E+7 ^a
RACM	4,57E+7 $\pm$ 1,56E+6 ^a	4,65E+6 $\pm$ 1,10E+5 ^a	1,30E+7 $\pm$ 7,27E+4 ^a	1,68E+6 $\pm$ 2,03E+5 ^a	2,71E+8 $\pm$ 1,98E+7 ^a
RACAI	4,64E+7 $\pm$ 8,45E+5 ^a	4,74E+6 $\pm$ 1,88E+5 ^a	1,30E+7 $\pm$ 1,68E+5 ^a	1,28E+6 $\pm$ 5,72E+4 ^a	2,46E+8 $\pm$ 3,03E+7 ^a
TT	1,90E+6 $\pm$ 3,24E+5 ^a	1,59E+7 $\pm$ 1,59E+5 ^a	3,59E+6 $\pm$ 2,52E+5 ^a	4,38E+6 $\pm$ 5,46E+4 ^a	1,51E+7 $\pm$ 7,66E+5 ^a
TF	1,96E+6 $\pm$ 7,86E+5 ^a	1,66E+7 $\pm$ 2,12E+5 ^a	3,57E+6 $\pm$ 1,50E+5 ^a	4,19E+6 $\pm$ 3,41E+5 ^a	1,58E+7 $\pm$ 5,69E+5 ^a
TCMC	2,08E+6 $\pm$ 3,56E+4 ^a	1,65E+7 $\pm$ 2,12E+5 ^a	3,65E+6 $\pm$ 6,89E+4 ^a	4,27E+6 $\pm$ 1,56E+5 ^a	1,38E+7 $\pm$ 1,63E+5 ^a
TACM	2,20E+6 $\pm$ 2,25E+5 ^a	1,58E+7 $\pm$ 1,21E+6 ^a	3,33E+6 $\pm$ 1,22E+5 ^a	4,35E+6 $\pm$ 2,79E+5 ^a	1,48E+7 $\pm$ 1,50E+6 ^a
TACAI	2,05E+6 $\pm$ 1,14E+5 ^a	1,64E+7 $\pm$ 1,80E+6 ^a	3,48E+6 $\pm$ 1,44E+5 ^a	4,31E+6 $\pm$ 4,31E+4 ^a	1,43E+7 $\pm$ 3,65E+5 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAI), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

Quadro 11.2- Efeito dos diferentes métodos de estabilização na concentração de compostos de aroma (expressos pela área dos picos cromatográficos) em três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Ácido isobutírico	Linalol	Decanoato de etilo	2-feniletanol	Ácido octanóico
BT	9,03E+5 $\pm$ 2,00E+5 ^a	1,61E+6 $\pm$ 3,49E+5 ^a	3,40E+7 $\pm$ 8,52E+5 ^a	7,86E+6 $\pm$ 3,82E+4 ^a	8,23E+6 $\pm$ 1,03E+6 ^a
BF	1,36E+6 $\pm$ 5,43E+5 ^a	1,11E+6 $\pm$ 1,63E+5 ^a	1,46E+8 $\pm$ 6,41E+6 ^b	5,19E+6 $\pm$ 6,81E+4 ^b	7,41E+6 $\pm$ 2,61E+5 ^a
BCMC	5,06E+5 $\pm$ 1,08E+4 ^a	1,50E+6 $\pm$ 3,14E+5 ^a	4,26E+7 $\pm$ 6,01E+6 ^a	7,40E+6 $\pm$ 9,08E+5 ^a	7,59E+6 $\pm$ 2,35E+5 ^a
BACM	6,80E+5 $\pm$ 9,35E+4 ^a	1,54E+6 $\pm$ 9,99E+4 ^a	3,51E+7 $\pm$ 3,32E+6 ^a	7,48E+6 $\pm$ 5,65E+5 ^a	7,58E+6 $\pm$ 5,25E+5 ^a
BACAI	7,70E+5 $\pm$ 9,05E+4 ^a	1,48E+6 $\pm$ 3,10E+5 ^a	3,96E+7 $\pm$ 7,01E+6 ^a	7,71E+6 $\pm$ 2,25E+5 ^a	7,68E+6 $\pm$ 3,02E+5 ^a
RT	n.d.	n.d.	1,88E+8 $\pm$ 1,98E+7 ^a	4,99E+6 $\pm$ 1,56E+5 ^a	3,23E+6 $\pm$ 2,19E+5 ^a
RF	n.d.	n.d.	1,74E+8 $\pm$ 3,80E+7 ^a	4,04E+6 $\pm$ 4,61E+5 ^b	3,48E+6 $\pm$ 1,71E+5 ^a
RCMC	n.d.	n.d.	1,66E+8 $\pm$ 1,78E+7 ^a	5,13E+6 $\pm$ 1,71E+5 ^c	3,27E+6 $\pm$ 3,57E+5 ^a
RACM	n.d.	n.d.	1,70E+8 $\pm$ 6,72E+6 ^a	4,95E+6 $\pm$ 1,14E+5 ^a	3,32E+6 $\pm$ 4,98E+4 ^a
RACAI	n.d.	n.d.	1,63E+8 $\pm$ 6,76E+6 ^a	4,97E+6 $\pm$ 1,08E+5 ^a	3,23E+6 $\pm$ 2,30E+5 ^a
TT	n.d.	n.d.	6,89E+6 $\pm$ 1,20E+5 ^a	2,16E+7 $\pm$ 2,72E+6 ^a	8,52E+5 $\pm$ 9,36E+4 ^a
TF	n.d.	n.d.	6,88E+6 $\pm$ 1,93E+5 ^a	3,01E+7 $\pm$ 1,74E+7 ^a	9,70E+5 $\pm$ 2,80E+5 ^a
TCMC	n.d.	n.d.	6,22E+6 $\pm$ 6,93E+4 ^a	3,10E+7 $\pm$ 9,96E+6 ^a	1,03E+6 $\pm$ 3,83E+5 ^a
TACM	n.d.	n.d.	6,72E+6 $\pm$ 3,24E+4 ^a	2,35E+7 $\pm$ 4,33E+6 ^a	7,09E+5 $\pm$ 9,45E+4 ^a
TACAI	n.d.	n.d.	6,75E+6 $\pm$ 3,42E+5 ^a	2,61E+7 $\pm$ 2,13E+6 ^a	9,52E+5 $\pm$ 2,35E+5 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAI), composto não detectado (n.d.), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%).

4.6 Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos vinhos

Os resultados revelaram a inexistência de diferenças estatisticamente significativas relativas aos atributos aromáticos e de boca detetadas pelo painel de provadores (Quadros 13 e 14) (Figuras 23, 24 e 25). Relativamente aos atributos de cor foi detetada uma diminuição significativa no caso do vinho rosado tratado pelo frio acompanhada por uma alteração, também significativa, do tom da sua cor relativamente quer à testemunha quer aos restantes tratamentos. Não foram detetadas diferenças significativas na limpidez nos três vinhos nem na cor e tonalidade dos vinhos branco e tinto (Quadro 12). Este resultado relativo ao exame visual do vinho rosado corrobora os resultados anteriormente abordados onde se registaram diminuições significativas quer dos parâmetros cromáticos quer da concentração de antocianinas no mesmo vinho estabilizado pelo frio. O mesmo resultado seria esperado no vinho tinto, já que o valor obtido para o parâmetro ΔE^* , relativo à diferença total de cor entre o tratamento e a testemunha, sendo muito superior a duas unidades determinaria que, teoricamente, essa diferença seria detetável pelo olho humano. Esta deteção não se verificou e poderá ser explicada pelo facto de o vinho tinto estudado apresentar uma intensidade de cor muito alta, sendo classificado como retinto, o que levará a que uma pequena diminuição da intensidade de cor não seja detetada pelo painel de provadores.

Uma vez que o painel usado foi de consumidores e não de *experts*, e por isso com uma menor sensibilidade, os resultados relativos aos atributos de aroma e de boca (que não revelaram qualquer diferença significativa) são concordantes com os resultados das análises químicas já que os mesmos revelaram diferenças muito ténues quer para as concentrações de compostos de aroma quer para as de compostos fenólicos.

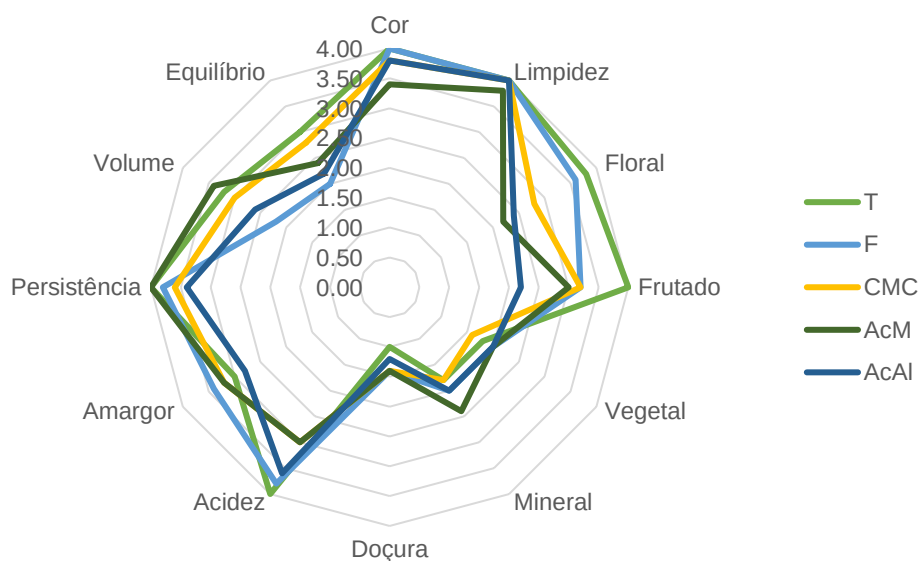


Figura 22 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho branco, Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl).

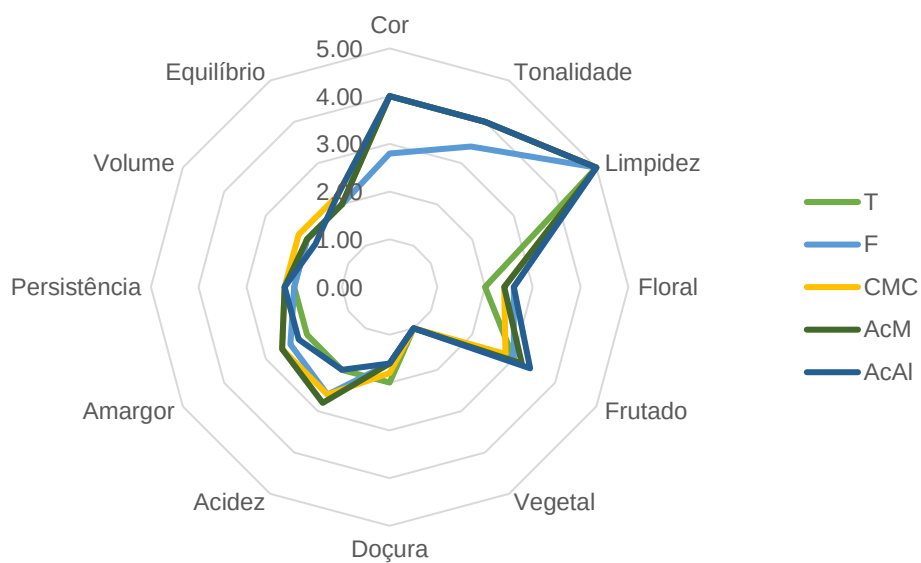


Figura 23 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho rosado, Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl).

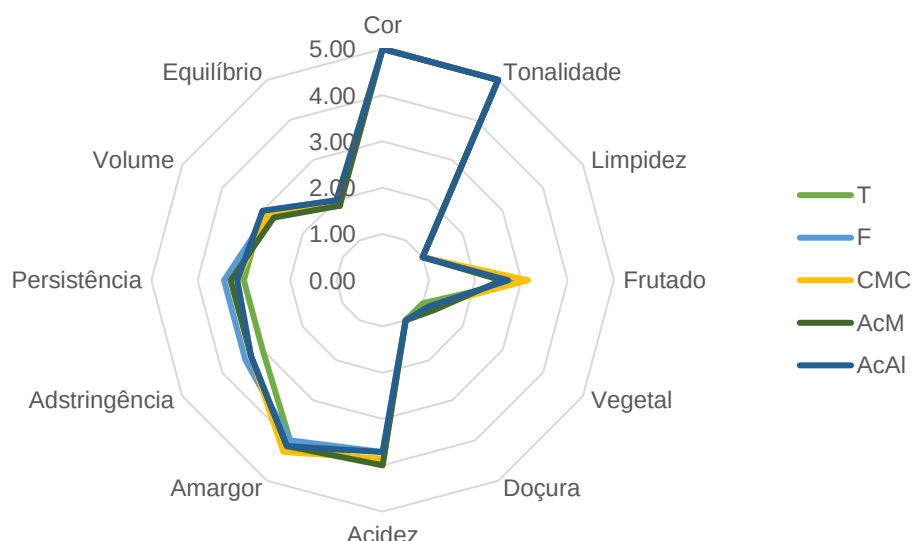


Figura 24 – Efeito dos diferentes métodos de estabilização nos atributos sensoriais no vinho Tinto, Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl).

Quadro 12 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos visuais de três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Cor	Tonalidade	Limpidez
BT	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	n.a.	4,00 $\pm$ 0,00 ^a
BF	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	n.a.	4,00 $\pm$ 0,00 ^a
BCMC	3,80 $\pm$ 0,45 ^a	n.a.	4,00 $\pm$ 0,00 ^a
BACM	3,40 $\pm$ 0,55 ^a	n.a.	3,80 $\pm$ 0,45 ^a
BACAl	3,80 $\pm$ 0,45 ^a	n.a.	4,00 $\pm$ 0,00 ^a
RT	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a
RF	2,80 $\pm$ 0,45 ^b	3,40 $\pm$ 0,55 ^b	5,00 $\pm$ 0,00 ^a
RCMC	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a
RACM	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a
RACAl	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	4,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a
TT	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
TF	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
TCMC	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
TACM	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
TACAl	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartárico (AcM), Vinho tratado com ácido algínico (AcAl), Atributo não avaliado (n.a.), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Duncan, 5%). Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a 5.

Quadro 13 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos de aroma de três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Floral		Frutado		Vegetal		Mineral	
BT	3.80±0.45	a	4.00±0.00	a	1.80±0.45	a	1.80±0.45	a
BF	3.60±0.89	a	3.20±0.84	a,b	2.00±0.00	a	2.00±0.00	a
BCMC	2.80±0.84	a	3.20±0.84	a,b	1.60±0.55	a	1.80±0.45	a
BAcM	2.20±1.10	a	3.00±1.22	a,b	2.00±0.00	a	2.40±0.89	a
BAcAI	2.40±1.14	a	2.20±0.45	b	2.00±0.71	a	2.00±0.00	a
RT	2.00±0.00	a	3.00±0.00	a	1.00±0.00	a	n.a.	
RF	2.60±0.55	a	3.00±0.00	a	1.00±0.00	a	n.a.	
RCMC	2.40±0.55	a	2.80±0.45	a	1.00±0.00	a	n.a.	
RAcM	2.40±0.89	a	3.20±0.45	a	1.00±0.00	a	n.a.	
RAcAI	2.60±1.14	a	3.40±0.55	a	1.00±0.00	a	n.a.	
TT	n.a.		3.00±0.00	a	1.00±0.00	a	n.a.	
TF	n.a.		3.00±0.00	a	1.14±0.45	a	n.a.	
TCMC	n.a.		3.14±0.90	a	1.14±0.45	a	n.a.	
TAcM	n.a.		2.57±0.53	a	1.29±0.89	a	n.a.	
TAcAI	n.a.		2.71±0.49	a	1.14±0.45	a	n.a.	

Vinho branco (**B**), Vinho rosado (**R**), Vinho tinto (**T**), Vinho testemunha (**T**), Vinho tratado pelo frio (**F**), Vinho tardado com Carboximetilcelulose (**CMC**), Vinho tratado com ácido metatartárico (**AcM**), Vinho tratado com ácido algínico (**AcAI**), Atributo não avaliado (**n.a.**), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%). Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a

Quadro 14 - Efeito dos diferentes métodos de estabilização na avaliação sensorial dos atributos de boca de três vinhos, um branco um rosado e um tinto (média $\pm$ desvio padrão).

	Doçura	Acidez	Amargor	Adstringência	Persistência	Volume	Equilíbrio
BT	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^a	n.a.	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.20 $\pm$ 0.45 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^a
BF	1.40 $\pm$ 0.55 ^a	3.80 $\pm$ 0.45 ^a	3.40 $\pm$ 0.55 ^a	n.a.	3.80 $\pm$ 0.45 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	2.00 $\pm$ 1.00 ^a
BCMC	1.40 $\pm$ 0.55 ^a	3.00 $\pm$ 1.00 ^a	3.20 $\pm$ 0.45 ^a	n.a.	3.60 $\pm$ 0.55 ^a	3.00 $\pm$ 1.00 ^a	2.80 $\pm$ 0.84 ^a
BACM	1.40 $\pm$ 0.55 ^a	3.00 $\pm$ 1.00 ^a	3.20 $\pm$ 0.45 ^a	n.a.	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.40 $\pm$ 0.89 ^a	2.40 $\pm$ 0.55 ^a
BACAI	1.20 $\pm$ 0.45 ^a	3.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.80 $\pm$ 0.45 ^a	n.a.	3.40 $\pm$ 0.89 ^a	2.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.20 $\pm$ 1.10 ^a
RT	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	n.a.	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a
RF	1.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.60 $\pm$ 1.34 ^a	2.40 $\pm$ 0.89 ^a	n.a.	2.00 $\pm$ 0.71 ^a	2.00 $\pm$ 0.71 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a
RCMC	1.80 $\pm$ 0.45 ^a	2.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.60 $\pm$ 0.89 ^a	n.a.	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a
RAcM	1.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.80 $\pm$ 0.84 ^a	2.60 $\pm$ 0.89 ^a	n.a.	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a
RAcAI	1.60 $\pm$ 0.55 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	n.a.	2.20 $\pm$ 0.45 ^a	1.80 $\pm$ 0.45 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a
TT	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.00 $\pm$ 0.00 ^a
TF	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.71 $\pm$ 0.49 ^a	4.00 $\pm$ 0.58 ^a	3.43 $\pm$ 0.53 ^a	3.43 $\pm$ 0.53 ^a	2.86 $\pm$ 0.69 ^a	1.86 $\pm$ 0.69 ^a
TCMC	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.86 $\pm$ 0.69 ^a	4.29 $\pm$ 0.76 ^a	3.29 $\pm$ 0.76 ^a	3.14 $\pm$ 0.69 ^a	2.86 $\pm$ 0.38 ^a	2.00 $\pm$ 1.00 ^a
TAcM	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	4.00 $\pm$ 0.82 ^a	4.14 $\pm$ 0.69 ^a	3.29 $\pm$ 0.76 ^a	3.29 $\pm$ 0.76 ^a	2.71 $\pm$ 0.49 ^a	1.86 $\pm$ 0.69 ^a
TAcAI	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.71 $\pm$ 0.95 ^a	4.14 $\pm$ 0.69 ^a	3.29 $\pm$ 0.76 ^a	3.14 $\pm$ 0.38 ^a	3.00 $\pm$ 0.58 ^a	2.00 $\pm$ 1.00 ^a

Vinho branco (B), Vinho rosado (R), Vinho tinto (T), Vinho testemunha (T), Vinho tratado pelo frio (F), Vinho tratado com Carboximetilcelulose (CMC), Vinho tratado com ácido metatartrato (AcM), Vinho tratado com ácido alginico (AcAI). Atributo não avaliado (n.a.), os valores médios procedidos pela mesma letra para cada vinho não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tukey, 5%). Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a 5.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Todos os processos de estabilização usados atualmente (frio, CMC e ácido metatartárico) provaram ser eficazes, ao passo que o ácido algínico provocou uma descida muito menor da condutividade. Ainda assim, o ácido algínico mostra alguma potencialidade como estabilizante tartárico uma vez que foi capaz de estabilizar um vinho com um grau de instabilidade baixo.

Tendo em conta que a estrutura dos polissacarídeos pode influenciar a sua capacidade estabilizante, dever-se-ia explorar outros polissacarídeos ácidos, alguns com diferentes pesos moleculares e composição em açúcares na estabilização tartárica de vinhos como alternativa à CMC.

O tratamento pelo frio mostrou ter poucos impactos ao nível dos compostos de aroma e ácidos fenólicos, no entanto observou-se um grande impacto na concentração da fração dos flavonoides e dos compostos corados nos vinhos rosado e tinto, tendo estes descido significativamente nos vinhos tratados pelo frio, sendo esta diferença detetada pelo painel de consumidores no caso do vinho rosado. Seria interessante, no futuro, repetir este estudo e submeter os vinhos a análise sensorial por um painel treinado de maneira a discernir se as modificações químicas provocadas pelo frio nos vinhos são detetáveis em prova.

Tanto o CMC como o ácido metatartárico revelaram não ter impactos significativos nas propriedades químicas dos vinhos estudados, excetuando o aumento da concentração de sódio que o CMC provoca, mas que não modifica as propriedades sensoriais dos vinhos. Destacou-se o facto de o CMC, contrariamente a parte da bibliografia, não ter apresentado nenhuma interação com os compostos corados dos vinhos rosado e tinto, pelo que seria de interesse futuro testar o CMC em diferentes vinhos rosados e tintos e caso os resultados serem semelhantes aos obtidos no presente trabalho confirmar-se-ia o CMC como uma alternativa bastante forte ao tratamento pelo frio, uma vez que não causa impactos químicos e sensoriais no vinho, é substancialmente mais barato que o tratamento pelo frio e é estável por grandes períodos de tempo contrariamente ao ácido metatartárico.

Alguns dos resultados obtidos apontam para uma possível interação do ácido algínico com as antocianinas, sendo por isso interessante, no futuro, uma análise mais profunda desta possível interação. Seria, ainda de grande interesse estudar a estabilidade do ácido algínico em vinhos ao longo do tempo de modo a validar este composto como estabilizante tartárico, já que apresenta alguma potencialidade para esta função, ainda para mais sendo um polissacarídeo de origem natural, algo cada vez mais valorizado pelos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M. C. (1992). Caracterização Química de quatro castas produtoras de vinho do porto durante a maturação- estudo dos açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos livres. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto.
- Andrea-Silva, J., Cosme, F., Ribeiro, L. F., Moreira, A. S. P., Malheiro, A. C., Coimbra, M. A. (2014). Origin of the pinking phenomenon of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(24), 5651–5659.
- Andrade, M. (2012). Estabilização Tartárica de Vinhos Tintos por Combinação de Nanofiltração e Permuta Catiônica. *Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Vinho. Escola Superior de Biotecnologia*. Universidade Católica Portuguesa. Porto.
- Araújo, I.M., Oliveira, J.M., Pereira, Ó.M., Maia, J.S., Maia, M.O., Amaral, A.J. (2003). Characterization and differentiation of "vinhos verdes" grape varieties by terpenic compounds. *Papers presented at the 3rd Symposium In Vino Analytica Scientia*. Aveiro, Portugal, 10-12.
- Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V., Teixeira, A., Ferreira, R. (2010). Protein haze formation in wines revisited. *The stabilising effect of organic acids*. *Food Chemistry*, 122(4), 1067–1075.
- Benítez, J., Palacios, V.M., Gorostiaga, P., Veas, R., Pérez., L. (2003). Comparison of electrodialysis and cold treatment on an industrial scale for tartrate stabilization of sherry wines. *Journal of Food Engineering*. 58 373–378.
- Berg, H.W., Keefer, R.M. (1958). Analytical Determination of tartrate stability in wine I. Potassium bitartrate. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10, 105-109.
- Berovic, M., Kosmerl, T. (2008). Monitoring of Potassium Hydrogen Tartrate Stabilization by Conductivity Measurement. *Acta chimica slovenica*, 55(3), 535–540.
- Blouin, J. (1982). Les techniques de stabilisation tartrique des vins par le froid. *Connaissance Vigne Vin*, 16, 63-77.
- Boyd A. & Chakrabarty A.M. (1995). Pseudomonas aeruginosa biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol*, 15(3):162-8
- Boulton, R. (1982). La cinétique de la précipitation du bitartrate de potassium des vins. *Revue Française d'œnologie*, 87 (3), 97-100.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1995). Principles and Practices of Winemaking. *The Chapman & Hall Enology Library*. New York.
- Bowyer, P., Gouty, C., Moine, V., Marsh, R., Battaglene, T. (2010). CMC a new potassium bitartrate stabilisation tool. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 558, 65-68.
- Bullio, C. (2002). TartarCheck. User's Handbook. Version 5/2/02.
- Cantarelli, C. (1963). Prévention des précipitations tartriques. *Annales de Technologie Agricole*, 12, 343-359.
- Cardoso, A. D. (2007). *O vinho da uva à garrafa*. Portugal. Lisboa.
- Claus, H., Tenzer, S., Sobe, M, Schlender, M., König, H., Fröhlich, J. (2014). Effect of carboxymethyl cellulose on tartrate salt, protein and colour stability of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 20,186–193.

- Crachereau, J. C., Gabas, N., Blouin, J., Hébrard, B., Maujean, A. (2001). Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose. *Bulletin de l'OIV*, 841–842.
- Curvelo-Garcia. (1988). Controlo de Qualidade dos Vinhos - *Química Enológica - Métodos Analíticos*, Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa, pp 420.
- Curvelo-Garcia, A. S. (2005). Pratiques oenologiques internationalement reconnus. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 20 (2), 105-130.
- Davaux, F., Charrier, F., Vinsonneau, E., Cottureau, P., Solanet, D., Chatelet, B., Cayla, L., Richard, N., Crachereau, J., (2013). Application des inhibiteurs de cristallisation et plus particulièrement des gommes de cellulose a la stabilisation tartrique des vins rouge et rose.
- Dunsford, P., Boulton, R. (1981a). 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, 100–105.
- Dunsford, P., Boulton, R. (1981b). The Kinetics of Potassium Bitartrate Crystallization from Table Wines. II. Effect of Temperature and Cultivar. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33, 106–110.
- Escudier, J.L., Moutounet, M., Saint-Pierre, B., Batlle, J.L. (1998). Electrodialyse appliquée a la stabilisation tartrique des vins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 32, 131-137.
- Flanzy, C. (1998). Oenologie fondements scientifiques et technologiques. *Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires*. França. Paris.
- Flanzy, C. (2003). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. A. Madrid Vicente, Madrid, pp783
- Gaillard, M., Ratsimba, B., Favarel, J. L. (1990). Stabilité tartrique des vins comparaison de différents tests, mesure de l'influence des polyphenols. *Revue Française d'OEnologie*, 123, 7-13.
- Garcia-Ruiz, J.M., Alcántara, R., Martin, J. (1995). Effects of Reutilized potassium bitartrate seeds on the stabilization of dry sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 525-528.
- Gerbaud V., Gabas N., Blouin J., Crachereau J. (2010). Study of wine tartaric acid salt stabilization by addition of carboxymethylcellulose (CMC): comparison with the « protective colloids » effect. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2010, 44, n°4, 231 – 242.
- Gomez, J., Palacios, V. M., Szekely, P., Veas, R., Perez, L. (2002). Estimacion de los costes directos de la estabilizacion tartarica mediante tratamiento por frio, intercambio protonico y electrodialisis. *Tecnologia del Vino*, 45e49, Julio-agosto.
- Gomez, J., Palacios, V. M., Szekely, P., Veas, R., Perez, L. (2003). Comparison of electrodialysis and cold treatment on an industrial scale for tartrate stabilization of sherry wines. *Journal of Food Engineering* 58, 373–378.
- Greeff, A., Robillard, B. Toit, W. (2012). Short- and long-term efficiency of carboxymethylcellulose (CMC) to prevent crystal formation in South African wine. *Food Additives and Contaminants Part a - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 29(9), 1374–1385.

- Guise, 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 (2014) 250–25.
- Kramling, T. E., Singleton, V. L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
- Lasanta, C., Gomez, J. (2012). Tartrate stabilization of wines. *Trends in Food Science & Technology* 28 52e59.
- Low, L. (2007). Evaluation of Tartrate Stabilisation Technologies for Wine Industry. *PhD thesis in Chemical Engineering*, University of Adelaide.
- Low, L. L., O'Neill, B., Ford, C., Godden, J., Gishen, M., & Colby, C. (2008). Economic evaluation of alternative technologies for tartrate stabilisation of wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1202e1206.
- Lubbers, S., Léger, B., Charpentier, C., Feuillat, M. (1993). Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levure sur la stabilité tartrique d'une solution hydro alcoolique modèle. *Journal International des Science de la Vigne et du Vin*, 27, 13-22.
- Maujean, A., Sausy, L., Vallée, D. (1985). Détermination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdes-protecteurs. *Revue Française d'Oenologie*, 100, 39-50.
- Maujean, A., Vallée, D., Sausy, L. (1986). Influence de la granulométrie des cristaux de tartre de contact et des traitements et collages sur la cinétique de cristallisation du bitartrate de potassium dans les vins blancs. *Revue Française d'oenologie*, 104, 34-41.
- 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: 225–235.
- Methacanon, P., Chaikumpollert, O., Thavorniti, P., Suchiva, K. (2003). Hemicellulosic polymer from Vetiver grass and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 54, 335–342.
- Minguez, S., Hernández, P. (1998). Tartaric stabilization of red, rosé and white wines with L (+)-Calcium tartrate crystal seeding. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 2: 177-182.
- Miniati, E., P. Damiani, and G. Mazza. (1992). Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Italian Journal of Food Science*. 4:109-116.
- Mira, H. (2007). Influência da aplicação de resinas permutadoras de lões, PVI-PVP e proteínas vegetais nas características dos vinhos. *Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia*. 298p.
- Modificação do Regulamento (CE) n.º 1493/1999 da OCM para o Regulamento (CE) n.º 2165/2005 do Conselho de 20 de dezembro de 2005.
- Moine, V., Dubourdieu, D. (1996). Mise au point d'une préparation industrielle de la levure, améliorant la stabilité protéique et inhibant les précipitations tartriques des vins. *L. Tec-Doc.*, 385-390.
- Moine-Ledoux, V., Dubourdieu, D. (2002). Une mannoprotéine à ancre GPI responsable de la stabilisation tartrique des vins. Derniers développements industriels. *Revue Française d'oenologie*, 193, 32-35.

- Moutounet, M., Bouissou, D., Escudier, J. L. (2010). Effets de traitement de stabilisation tartrique de vins rouges par une gomme de cellulose. *Revue internet de viticulture et oenologie*, 6/2.
- Nunes, M. (2011). A electrodialise na estabilidade tartárica dos vinhos. Comparação com o método clássico. *Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia*, Universidade Técnica de Lisboa.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin), (2017). *International Oenological Codex. Edition Officielle*, Paris.
- Piracci, A., Garofalo, A. (1990). Impreviste acquisizione sulle dimensioni molecolari di colloidi del vino che inibiscono la precipitazione del bitartrato di potassio. *Revue Française d'oenologie*, 43,59-53.
- Rebelein, H. (1969). Dosage rapide de l'acide tartrique. *Office International de la Vigne et du Vin, Feuillet Vert*. 431.
- REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 DA COMISSÃO de 10 de julho de 2009 que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.
- Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F.M., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F. (2014) Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chemistry*. 159 47–5.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P., Sudraud, P., 1972. *Traité d'Oenologie. Sciences et techniques du vin*, Dunod. Paris : 1, 240-241.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1998) *Traité d'oenologie : Tome 2, Chimie du Vin, Stabilisation et Traitement*. Dunod, Paris. 519p.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. (2nd ed.)*. (Vol. 2). France: Bordeaux. Wiley & Sons Ltd., Chichester, England
- Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 9, 2649–2652.
- Ripa, J.S., Mendoza, M.C., Martinez, N., Echeverría, C., Aguirre Lopez, L., Diestro, M., Vano, L., Betet, X., Escudero, G. (2013). Estabilización Tartárica de Vinos Tintos de Navarra por Resinas de Intercambio Catiónico (RIC) - Análisis Físico-químico e Organoléptico.
- Rodriguez-Clemente, R., Correa-Gorospe, I., De Castro, J.J. (1990). A new method for the stabilization of wines with respect to the potassium bitartrate precipitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 16-20.
- Rondeau, N. (2011). Are there any option to cold treatment? Acedido em Maio, 2017. <http://www.in-enologia-veritas.com/2011/01/existen-alternativas-a-la-estabilizacion-por-frio/>
- Rories, A., Sire, Y., Bouissou, D., Goulesque, S., Moutounet, M., Bonneaud, D., Lutin, F. (2011) Environmental Impacts of Tartaric Stabilisation Processes for Wines using Electrodialysis and Cold Treatment. *South African Journal of Enology and Viticulture*. Vol 32, No. 2.

- Ruffner, H.P., (1982), Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis. *Vitis, Siebeldingeir*, 21, 3, 247-259.
- Salagoity, M. H., Guyon, F., René, L., Gaillard, L., Lagrèze, C., Domec, A., Baudouin, M., & Médina, B. (2011). Quantification method and organoleptic impact of added carboxymethylcellulose to dry white wine. *The Royal Society of Chemistry*, 3, 380-384.
- Salgues, M. & Bidan, P. (1988). Los agentes de clarificación y de estabilización de las bebidas. *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias alimentares*. Ed. Acribia. Madrid.
- Santos, P. C., Pereira, O. M., Simões, F. J., Pinho, T. M. N. (2000). Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: estudo comparativo da eletrodialise e de um método tradicional. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 15 (2), 95-108.
- Scotti, B., Gomes, D., & Santos, J. (2010). Carboximetilcelulose contributo para a sua melhor utilização. *Enovitis*, edição outubro, novembro, dezembro, 36-39.
- Singleton, V. L., & Kramling, T. E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 157-160.
- Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O. & Cavalheiro, E. T. G. (2014). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclet. Quím.*, vol.29, n.2, pp.57-64.
- Somers, T.C. Evans, M.E. (1977) Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *J. Sci. Food Agric.* 28: 279-287.
- Sommer, S., Dickescheid, C., Harbertson, J., Fischer, U., Cohen, S. (2016). Rationale for Haze Formation after Carboxymethyl Cellulose (CMC) Addition to Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 6879–6887.
- Spagna, G., Pifferi, P. G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G., & Palmonari, R. (1996). The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29, 241-248.
- Stojanovic, Z., Jeremic, K., Jovanovic, S., & Lechnerb, M. D. (2005). A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethylcellulose starch. *Starch/Stärke*, 57, 79–83.
- Usseglio-Tomasset, L., Bossia, P.D., Delfini, C., & Ciolfi, G. (1980). I vini Recioto e Amarone della Valpolicella. *Vini d'Itália*, 125, 85-97.
- Vigara, J., & Amores, R. (2010). Química Enológica. AMV Ediciones y Mundi (1st ed., pp. 307–324). Mundi-Prensa.
- Wurdig, G., Muller, T., Friedrich, G. (1982). Méthode pour caractériser la stabilité du vin vis-à-vis du tartre par détermination de la température de saturation. *Bull. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 613, 220-229.
- Zoecklein, B.W., Fulgelsang, K.C., Gump, B.H., & Nury, F.S., (1995). Wine Analysis and Production. Ed Chapman&Hall. 612p.