

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

O uso do poliaspartato de potássio na estabilização tartárica de vinhos

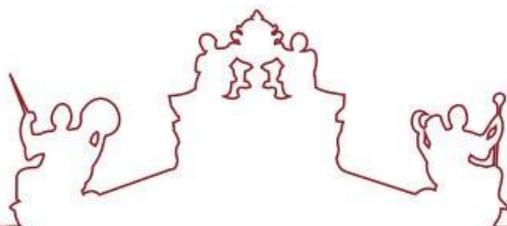
Inês Feitinha Severino da Silva e Rosa

Orientador(es) / Maria João Pires de Bastos Cabrita

Évora 2019

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri.





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

O uso do poliaspartato de potássio na estabilização tartárica de vinhos

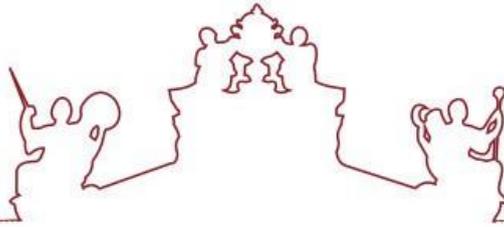
Inês Feitinha Severino da Silva e Rosa

Orientador(es) / Maria João Pires de Bastos Cabrita

Évora 2019

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri.





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | João Manuel Mota Barroso (Universidade de Évora)
- Vogal | Raquel Marta Neves dos Santos Garcia (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Maria João Pires de Bastos Cabrita (Universidade de Évora)

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo Da Vinci

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria João Cabrita, por todo o apoio que me deu, pela ajuda, por se mostrar sempre disponível e interessada e por toda a partilha de conhecimento. Agradeço ainda por me ter disponibilizado o Laboratório de Enologia da Universidade de Évora, para a realização de todas as análises necessárias para a realização deste estudo.

Agradeço a toda a equipa do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora, pelo acolhimento e pela simpatia com que me receberam. Agradeço em particular ao técnico de laboratório Rui Bicho, por me ter ajudado a analisar todos os vinhos e por me ter ajudado nas análises de estabilização tartárica, foi uma preciosa ajuda. À Catarina, ao Doutor Nuno Martins e à Doutora Raquel Garcia por me terem ajudado com o método do HPLC, sem eles teria sido muito mais difícil.

Agradeço a simpatia e a generosidade do Engenheiro Francisco Pimenta por me ter disponibilizado todos os vinhos que foram utilizados neste estudo.

Agradeço a todos os meus amigos, incluindo todos os colegas de turma de mestrado, por todo o ânimo e motivação, por todas as gargalhadas, por toda a amizade, por todos os brindes, por todos os momentos bons que vivemos. Sem eles nada disto teria a mesma piada. Que os laços criados permaneçam por muitos mais anos!

Ao meu namorado, João, por todo o amor, por toda a amizade, por toda a motivação e por ter sido o meu braço direito nesta caminhada em Évora.

A toda a minha família por ter sempre acreditado em mim, por todo o carinho e por todas as palavras bonitas. Obrigada por apoiarem todas as minhas escolhas e por me darem a segurança que preciso. Agradeço em particular aos meus pais, Adelaide e Pedro, pelo amor, pela dedicação, pelas palavras na hora certa e pela força, sem vocês isto não teria sido possível.

Resumo

A instabilidade tartárica em vinhos brancos ainda é uma preocupação em enologia, existindo várias técnicas para prevenir este problema associado à precipitação dos sais do ácido tartárico. Para além da mais usual, através da utilização do frio, podem ser utilizados aditivos que inibem o processo de formação dos cristais responsáveis pela instabilidade. Com o presente estudo, pretende-se testar um novo aditivo estabilizante, recentemente autorizado, designado por poliaspartato de potássio, na inibição da precipitação dos cristais de ácido tartárico nos vinhos, e comparar a sua eficiência com a de outros métodos de estabilização tartárica disponíveis.

Para tal, estabilizaram-se tartaricamente vinhos brancos através do frio e pela adição de manoproteína, ácido metatartárico e poliaspartato de potássio.

A estabilidade tartárica foi determinada pelo teste do mini contacto, antes e após a realização dos tratamentos de estabilização tartárica, de forma a avaliar e a comparar a eficácia dos diferentes métodos de estabilização utilizados. Por outro lado, a estabilidade tartárica ao longo do tempo, foi também avaliada nas amostras de vinho tratadas com poliaspartato de potássio.

Palavras-Chave: Vinho; estabilização tartárica; poliaspartato de potássio; manoproteínas; ácido metatartárico; estabilização a frio.

The use of potassium polyaspartate in the tartaric stabilization of wines

Abstract

The tartaric instability in white wines is still a problem in oenology, and various techniques exist to prevent this problem associated with the precipitation of tartaric acid's salts. Besides the most common, by using cold, additives can be used to inhibit the process of formation of the crystals responsible for the instability. With this study, the aim is to test a new stabilizing additive recently authorized, called potassium polyaspartate, on the inhibition of tartaric acid crystals precipitation in wines, and compare its efficiency with that of other available methods for tartaric stabilization.

To this end, white wines were tartarically stabilized by cold and, by adding a mannoprotein, metatartaric acid, and potassium polyaspartate.

The tartaric stability was determined by the mini contact test, before and after doing the tartaric stabilization treatments, in order to evaluate and compare the efficacy of the different used methods for stabilization. On the other hand, the tartaric stability over time was also evaluated in the wine samples treated with potassium polyaspartate.

Keywords: Wine; tartaric stabilization; potassium polyaspartate; mannoproteins; metatartaric acid; cold stabilization.

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice Geral.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas	VII
Abreviaturas	IX
Unidades de Medida	IX
1. Introdução	1
2. Os principais ácidos orgânicos das uvas e dos vinhos	3
3. O ácido tartárico e os seus sais	5
4. Instabilidade tartárica: o fenómeno e os sais responsáveis	7
5. Sobressaturação e cristalização dos sais tartáricos.....	9
6. Fatores que influenciam o processo de cristalização	13
7. Testes de avaliação da estabilidade tartárica.....	14
7.1. Teste por refrigeração.....	15
7.2. Teste do mini contacto	15
7.3. Determinação da temperatura de saturação.....	17
8. Tratamentos para alcançar a estabilidade tartárica.....	17
8.1. Estabilização pelo frio	18
8.2. Utilização de aditivos	21
8.2.1. Manoproteínas.....	22
8.2.2. Carboximetilceluloses	25
8.2.3. Ácido metatartárico	28
8.2.4. Poliaspartato de potássio, o novo aditivo autorizado	30

8.2.4.1. Como surgiu em enologia.....	32
8.2.4.2. Estudos realizados até ser autorizado.....	34
8.3. Resinas de troca catiónica.....	37
8.4. Eletrodialise.....	38
9. Materiais e Métodos.....	41
9.1. Vinhos utilizados no estudo.....	41
9.2. Delineamento do ensaio.....	41
9.2.1. Estabilização tartárica dos vinhos através de diferentes tratamentos.....	41
9.2.2. Efeito do poliaspartato de potássio na estabilidade tartárica dos vinhos ao longo do tempo.....	43
9.2.3. Determinação do teor de ácido aspártico nos vinhos.....	45
9.3. Métodos Analíticos.....	45
9.3.1. Estabilidade proteica a quente.....	45
9.3.2. Teste do mini contacto.....	47
9.3.3. Envelhecimento acelerado.....	48
9.3.4. HPLC (High performance liquid chromatography).....	48
10. Resultados e Discussão.....	53
10.1. Estabilidade proteica e tartárica dos vinhos.....	54
10.2. Efeito dos diferentes tratamentos na estabilidade tartárica dos vinhos.....	56
10.3. Efeito do poliaspartato de potássio na estabilidade tartárica dos vinhos ao longo do tempo, comparativamente ao ácido metatartárico e à manoproteína.....	61
10.4. Avaliação do teor em ácido aspártico ao longo do tempo.....	65
11. Conclusões.....	67
12. Referências Bibliográfica.....	69
13. Anexos.....	73
13.1. Resultados obtidos por HPLC.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do L(+) – ácido tartárico, do L(-) – ácido málico e do ácido cítrico (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006).....	5
Figura 2. Cristais de bitartarato de potássio isolados de vinho branco (1) e de vinho tinto (2). A escala das imagens está em milímetros (Coulter <i>et al.</i> , 2015).8	
Figura 3. Localização das manoproteínas nas paredes das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Dubourdieu e Moine-Ledoux, 2007).	23
Figura 4. Estrutura da celulose e da carboximetilcelulose (Coulter <i>et al.</i> , 2015).	26
Figura 5. Morfologia dos cristais de bitartarato de potássio sem e com a adição de uma CMC ao vinho (Gerbaud <i>et al.</i> , 2010).....	27
Figura 6. Esterificação do ácido tartárico que dá origem ao ácido metatartárico (Morello, 2012).	29
Figura 7. Hidrólise do poliaspartato de potássio em ácido L-aspártico (OIV, 2019).	31
Figura 8. Esquema do modo de funcionamento da eletrodialise e à direita uma membrana catiónica em pormenor (MC – membrana catiónica; MA – membrana aniónica) (Santos <i>et al.</i> , 2000).....	39
Figura 9. Ensaio realizado em garrafas de 250 mL, etiquetadas com o nome do tratamento a que as amostras de vinho foram submetidas.	43
Figura 10. Ensaio das 48 amostras de vinhos em garrafas de 150 mL que foram colocadas na estufa.	44
Figura 11. Turbidímetro utilizado para medir a turbidez das amostras de vinho.	46
Figura 12. Aparelho utilizado no teste do mini contacto.	47
Figura 13. Modo de funcionamento de um sistema HPLC (Costa, 2015).	49
Figura 14. Cromatograma de um vinho tinto, obtido por HPLC, das derivativas de aminas biogénicas, aminoácidos e do ião amónio, a 280 nm. O ácido aspártico corresponde ao pico que está assinalado com o número 1 (Gómez-Alonso <i>et al.</i> , 2007).	50

Figura 15. Estabilidade tartárica dos 4 vinhos brancos dada pelos resultados obtidos no teste do mini contacto ($\mu\text{S}/\text{cm}$).	56
Figura 16. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho, antes e após os tratamentos de estabilidade tartárica. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.....	59
Figura 17. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho após os tratamentos de estabilização tartárica, antes e depois do envelhecimento acelerado. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.....	63
Figura 18. Concentração de ácido aspárticos (mg/L) nos vinhos V1, V2, V3 e V4 no tempo 0 e no tempo 2.	66

Índice de Tabelas

Tabela 1. Solubilidade do bitartarato de potássio (g/L) em soluções modelo (Boulton <i>et al.</i> , 1999)	9
Tabela 2. Percentagem de ácido tartárico e dos seus iões em função do pH (Boulton <i>et al.</i> , 1999).	10
Tabela 3. Tratamentos de estabilização tartárica efetuados nos vinhos utilizados no ensaio.....	42
Tabela 4. Estado da turvação dos vinhos em função da sua turbidez (NTU)...	46
Tabela 5. Estabilidade do vinho em função da sua variação da condutividade elétrica (μS).....	48
Tabela 6. Análise sumária dos vinhos V1, V2, V3 e V4.	53
Tabela 7. Valores de turbidez dos 4 vinhos brancos.....	54
Tabela 8. Valores de turbidez medidos da amostra aquecida e da amostra testemunha dos 4 vinhos brancos.....	54
Tabela 9. Valores da condutividade elétrica inicial, final e da sua variação, bem como da temperatura de saturação, determinados através do teste do mini contacto, dos 4 vinhos brancos.	55
Tabela 10. Valores da variação da condutividade elétrica, obtidos pelo teste do mini contacto, das amostras de vinho sujeitas aos diferentes tratamentos de estabilidade tartárica.	57

Tabela 11. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho depois do envelhecimento acelerado.....	61
Tabela 12. Concentração de ácido aspártico (mg/L) nas amostras de vinho no tempo 0 e no tempo 2. Os valores são a média \pm desvio padrão das 3 amostras de cada vinho utilizadas na análise.....	65
Tabela 13. Tempo de retenção (minutos) e área dos picos do aspartato e do padrão interno, obtidos por HPLC, de amostras dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo, antes de serem submetidos a qualquer tipo de tratamento.	74
Tabela 14. Tempo de retenção (minutos) e área dos picos do aspartato e do padrão interno, obtidos por HPLC, de amostras dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo tratados com PASP1, numa dose de 100mg/L, após o envelhecimento acelerado.....	75

Abreviaturas

- **Ca²⁺** - ião cálcio
- **Fe³⁺** - ião ferro
- **H⁺** - ião hidrogénio
- **H₂T** - Ácido Tartárico
- **HT⁻** - ião bitartarato
- **K⁺** - ião potássio
- **Na⁺** - ião sódio
- **T²⁻** - ião tartarato
- **T_{sat}** - Temperatura de saturação
- **AMT** - Ácido metatartárico
- **CMC** - Carboximetilcelulose
- **EFSA** - European Food Safety Authority
- **HPLC** - High Performance Liquid Chromatography
- **MAN** - Manoproteína
- **MIPAAF** - Ministério da política agrícola, alimentar e florestal italiano
- **OIV** - Organização Internacional da Vinha e do Vinho
- **PASP** - Poliaspartato de potássio
- **PC** - Produto de concentração
- **pK** - Constante de dissociação
- **PS** - Produto de solubilidade
- **SO₂** - Dióxido de enxofre
- **TCa** - Tartarato de cálcio
- **THK** - Bitartarato de potássio

Unidades de Medida

- **% v/v alc.** - Percentagem volume/volume de álcool
- **cm³** - Centímetro cúbico

- **μL** - Microlitro
- **μm** - Micrometro
- **μS** - Microsiemen
- **cm** - Centimetro
- **g** - Grama
- **hL** - Hectolitro
- **L** - Litro
- **meq** - Miliequivalente
- **mg** - Miligrama
- **mL** - Mililitro
- **mm** - Milimetro
- **NTU** - Unidades Nefelométricas de Turbidez
- **°C** - Graus Celsius
- **S** - Siemen
- **V** - Volt

1. Introdução

A instabilidade tartárica é uma grande preocupação em enologia, principalmente nos vinhos brancos. Esta instabilidade deve-se à precipitação dos sais do ácido tartárico, nomeadamente o bitartarato de potássio e o tartarato de cálcio, originando cristais, que quando se formam em vinhos já engarrafados, depositam-se no fundo da garrafa.

Os consumidores de vinho são bastante exigentes no que toca à sua compra, sendo o aspeto visual do produto muito importante. A existência de limpidez e brilho são características que os consumidores apreciam nesta bebida e com as quais o mercado os habituou, de forma que qualquer depósito no fundo de uma garrafa de vinho, desvaloriza o produto e torna-o menos desejado pelos consumidores. Apesar dos cristais resultantes da precipitação tartárica não alterarem a qualidade do vinho, nem causarem problemas de saúde, visualmente não são apelativos para o consumidor. Muitas vezes estes confundem-nos com restos de vidro, aditivos ou alterações microbiológicas, havendo uma grande preocupação por parte dos produtores de vinho em garantir a estabilidade tartárica.

Existem várias formas de alcançar esta estabilidade nos vinhos. A mais tradicional é o tratamento pelo frio, que favorece a precipitação dos sais do ácido tartárico, sendo estes depois removidos por filtração. Existem também aditivos que podem ser adicionados ao vinho de forma a inibir a formação e o crescimento dos cristais tartáricos, nomeadamente, o ácido metatartárico, as carboximetilceluloses (CMC's) e as manoproteínas, porém cada um deles apresenta alguma limitação. O ácido metatartárico, apesar de ser bastante eficaz, é muito instável no vinho ao longo do tempo, já que se hidrolisa e transforma-se em ácido tartárico, devendo ser adicionado apenas em vinhos para consumir num curto espaço de tempo e que não são para envelhecer. As CMC's, apesar de serem estáveis e eficientes em vinhos brancos, em vinhos tintos podem causar instabilidade na cor. Já as manoproteínas, necessitam de ser primeiro testadas para que se conheça a sua dose ideal e a sua eficácia, dado o seu efeito ser muito variável.

Para além dos referidos, existem outros métodos mais recentes, como a eletrodialise e as resinas de troca iónica, que também podem ser utilizados para alcançar a estabilização tartárica, ao removerem o excesso de iões de potássio e de cálcio do vinho (Gerbaud *et al.*, 2010).

Mais recentemente surge o poliaspartato de potássio, havendo ainda poucos estudos acerca do seu efeito nas características do vinho, porém é apontado como um aditivo a utilizar para alcançar a estabilidade tartárica.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do poliaspartato de potássio na estabilização tartárica de vinhos, comparando-a com a de outros métodos utilizados em enologia com este fim, nomeadamente o tratamento pelo frio, a adição de ácido metatartárico e a adição de manoproteínas. Foi ainda avaliada a performance do poliaspartato de potássio na estabilidade tartárica dos vinhos ao longo do tempo, recorrendo-se a uma técnica de envelhecimento acelerado de maneira a que o processo de envelhecimento dos vinhos fosse mais rápido.

2. Os principais ácidos orgânicos das uvas e dos vinhos

Os ácidos orgânicos presentes nas uvas, que mais contribuem para a sua acidez, são o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Existem outros ácidos nos vinhos, formados durante a vinificação, também importantes, mas com um menor contributo para a acidez, como o ácido succínico, formado durante a fermentação alcoólica, e o ácido láctico, resultante da fermentação malolática (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

Os ácidos acima referidos pertencem ao grupo dos ácidos fixos, que por oposição aos ácidos voláteis, não se conseguem remover por destilação e contribuem para a acidez fixa dos vinhos. Esta acidez controla o pH do vinho, englobando todos os ácidos orgânicos, à exceção dos voláteis como é o caso do ácido acético, o ácido que mais contribui para a acidez volátil (Jackson, 2000).

O ácido tartárico, em particular o isómero L(+)-tartárico, é o ácido mais importante dos vinhos, com um teor que pode variar entre 1500 e 4000 mg/L. Trata-se de um ácido raro nas outras espécies do reino vegetal, considerando-se por esse motivo específico das uvas. As suas características organoléticas definem-se como um “gosto ácido puro” e quimicamente é um ácido forte ($pK_1=3,12$ e $pK_2=4,19$, a 25°C e 10% v/v alc.), o que faz dele um ácido determinante no valor da acidez fixa e do pH dos vinhos (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

No final da fase do crescimento vegetativo da vinha, este ácido pode existir nas uvas em concentrações superiores a 15 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Durante a maturação destas, o teor em ácido tartárico vai diminuindo por fenómenos de combustão e de diluição (Curvelo-Garcia e Barros, 2015), porém a sua concentração não diminui de uma forma tão acentuada como a do ácido málico durante este período (Jackson, 2000). Para além disso, durante o processo de vinificação, a concentração de ácido tartárico também diminui, inclusive durante e a fermentação alcoólica, bem como, após o engarrafamento do vinho, devido à precipitação dos sais tartáricos de potássio e de cálcio, pela sua insolubilidade (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

Nos mostos, provenientes de uvas de vinhas localizadas em regiões mais frias, a concentração de ácido tartárico pode ser superior a 6 g/L, enquanto que

em regiões mais quentes, os mostos provenientes das uvas dessas vinhas têm concentrações de ácido de tartárico mais baixas, podendo estar entre 2-3 g/L, devido às temperaturas mais altas aí existentes e que provocam uma degradação superior deste ácido (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Por outro lado, o ácido málico tem um gosto “ácido puro e verde” e encontra-se presente nas uvas e nos vinhos, podendo atingir os 4000 mg/L (Curvelo-Garcia e Barros, 2015). O ácido málico natural da uva é o isómero L(-) e resulta de uma reação secundária da fotossíntese, ocorrendo principalmente nas folhas adultas da videira (Rizzon & Sganzerla, 2007). É um ácido ligeiramente mais fraco que o ácido tartárico ($pK=4,53$, a $25^{\circ}C$ e 10% v/v alc.) (Curvelo-Garcia e Barros, 2015), sendo que estes dois ácidos podem contribuir para mais de 90% da acidez total das uvas (Jackson, 2000).

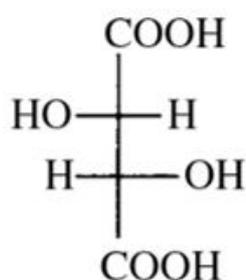
Ocorre uma diminuição do teor em ácido málico, durante o amadurecimento das uvas, após o pintor, podendo reduzir-se para metade, não só por fenómenos de diluição devido ao crescimento das uvas, como por fenómenos de combustão (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Nesta fase, a respiração celular das uvas é o principal fator responsável pela diminuição deste ácido (Curvelo-Garcia e Barros, 2015), sendo que em zonas mais frias os mostos podem ter entre 4-6,5 g/L de ácido málico, e em zonas mais quentes, que obrigam a uma respiração celular superior, os valores podem rondar 1-2 g/L (Jackson, 2000).

Nos vinhos, o ácido málico pode ainda diminuir quando ocorre a fermentação malolática, fenómeno este que ao transformar ácido málico em ácido láctico, não só desacidifica os vinhos, como altera as suas características organoléticas, tendo uma grande importância na sua qualidade, principalmente nos vinhos tintos onde é mais recorrente a sua prática (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

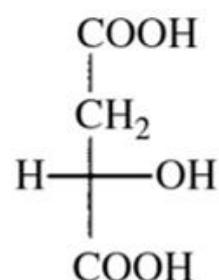
Relativamente ao ácido cítrico, com um gosto ácido puro e fresco, típico dos citrinos, tem origem nas uvas e a sua concentração pode atingir 500 mg/L. (Curvelo-Garcia e Barros, 2015). As suas concentrações nos mostos e nos vinhos podem estar entre 0,5 a 1 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Outra característica interessante do ácido cítrico e que também aumenta o seu interesse em enologia, é o facto de conseguir complexar o ião Fe^{3+} , auxiliando como agente bloqueador da casse férica nos vinhos. Para além disso, este ácido é muito utilizado para melhorar a acidez gustativa dos vinhos, com um limite máximo permitido de 1 g/L (Curvelo-Garcia e Barros, 2015).

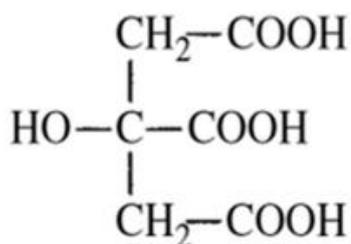
Na figura 1 apresentam-se as estruturas químicas dos principais ácidos orgânicos das uvas e dos vinhos.



L (+) - Ácido Tartárico



L (-) - Ácido Málico



Ácido Cítrico

Figura 1. Estrutura química do L(+) – ácido tartárico, do L(-) – ácido málico e do ácido cítrico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

3. O ácido tartárico e os seus sais

O ácido tartárico (H_2T) é um ácido fraco, que em solução se dissocia em dois iões, o bitartarato (HT^-) e o tartarato (T^{2-}). A proporção destas três formas é

dependente do pH, da temperatura, da concentração em etanol e de forças iónicas presentes no vinho (Coulter *et al.*, 2015).

As seguintes equações representam a dissociação do ácido tartárico, um ácido diprótico:

- $\text{H}_2\text{T} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HT}^-$
- $\text{HT}^- \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{T}^{2-}$

O que se pode verificar é que na sua primeira reação de dissociação, a perda de um ião H^+ pelo ácido tartárico origina o ião bitartarato (HT^-). Quando ocorre a segunda reação de dissociação do ácido tartárico, ocorre novamente a perda de um ião H^+ , desta vez pelo ião bitartarato, originando o ião tartarato (T^{2-}) (Lasanta e Gómez, 2012).

Ao pH do vinho e na presença dos iões Ca^{2+} e K^+ , tendo em conta as equações de dissociação do ácido tartárico, este pode ser encontrado na forma de 5 sais diferentes, nomeadamente:

- Bitartarato de potássio (THK), também conhecido por hidrogenotartarato de potássio, com a fórmula $\text{KHC}_4\text{H}_6\text{O}_6$;
- Tartarato neutro de cálcio (TCa), com a fórmula $\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$;
- Tartarato neutro de potássio (K_2T);
- Tartarato duplo de potássio e cálcio;
- Tartromalato de cálcio (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

A existência de potássio e cálcio no meio, em conjunto com os iões de tartarato e de bitartarato levam à formação de bitartarato de potássio (THK) e de tartarato de cálcio (TCa), os sais protagonistas da instabilidade tartárica nos vinhos. As equações que descrevem a dissociação destes sais são as que se seguem (Lasanta e Gómez, 2012):

- $\text{THK} \leftrightarrow \text{K}^+ + \text{HT}^-$
- $\text{TCa} \leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{T}^{2-}$

O potássio é o principal catião do vinho, existindo normalmente em concentrações elevadas, com teores entre 0,5 e 2 g/L. Este mineral, é um dos poucos que passa pela seiva que passa no floema, na qual os açúcares provenientes da fotossíntese são translocados. É por esse motivo que durante a maturação, em que ocorre um enriquecimento das uvas em açúcar pela via floémica, que existe também um enriquecimento destas em potássio (Simões *et al.*, 2013).

O cálcio pelo contrário, existe no vinho em quantidades mais baixas, podendo ter um teor entre 30 a 200 mg/L, porém a sua concentração não depende apenas daquela que existe nas uvas, mas também das operações tecnológicas realizadas durante a vinificação e das condições de armazenamento do vinho (Simões *et al.*, 2013). De facto, os teores de cálcio no vinho podem aumentar devido a adições de carbonato de cálcio (CaCO_3), utilizado em correções ácidas, por adições de bentonite, e até mesmo, pelo seu fornecimento através do material do depósito onde o vinho se encontra armazenado (Margalit, 2012)

Este catião como é bivalente, é mais reativo na precipitação que o potássio (Simões *et al.*, 2013).

4. Instabilidade tartárica: o fenómeno e os sais responsáveis

A instabilidade tartárica nos vinhos deve-se à cristalização dos sais do ácido tartárico, também conhecidos como tartaratos, nomeadamente o bitartarato de potássio (THK) e o tartarato de cálcio (TCa) (Gerbaud *et al.*, 2010). A solubilidade destes sais diminui com a presença de etanol e com a conservação do vinho a temperaturas baixas, o que faz com que precipitem (Corti e Paladino, 2016).

A cristalização dos tartaratos é um fenómeno imprevisível e que pode ocorrer durante a vinificação, envelhecimento ou só depois do engarrafamento, o que faz com que seja importante a estabilização tartárica dos vinhos. A instabilidade tartárica não afeta as características organoléticas do vinho, porém para muitos consumidores, a presença de cristais no fundo das garrafas é um fator depreciativo, o que faz com que haja uma grande preocupação por parte

dos enólogos em garantir a estabilidade tartárica dos vinhos, de maneira a que se atinja a qualidade exigida pelos consumidores (Simões *et al.*, 2013).

Na figura 2 mostram-se imagens de cristais de bitartarato do potássio isolados de vinhos brancos e tintos.



Figura 2. Cristais de bitartarato de potássio isolados de vinho branco (1) e de vinho tinto (2). A escala das imagens está em milímetros (Coulter *et al.*, 2015).

Em vinhos espumantes, a instabilidade tartárica causa ainda outro problema para o consumidor, uma vez que a presença de microcristais de bitartarato de potássio na garrafa, pode levar à formação de demasiadas bolhas quando esta é aberta, causando efervescência excessiva. Isto faz com que se perca uma grande quantidade de vinho, o que não é desejado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Por este motivo a estabilidade tartárica em vinhos base de espumantes é importante.

A instabilidade causada pelo tartarato de cálcio é mais difícil de controlar que a causada pelo bitartarato de potássio, porém é menos comum (Jackson, 2000). O tartarato de cálcio é um sal relativamente insolúvel, cerca de 10 vezes menos solúvel que o bitartarato. Prevenir a sua precipitação é difícil já que a precipitação do bitartarato de potássio, não induz a precipitação do tartarato de

cálcio e, para além disso, a sua solubilidade não é muito sensível à temperatura, o que ainda dificulta mais. Felizmente, o tempo necessário para a nucleação espontânea do tartarato de cálcio é muito mais longo que no bitartarato de potássio, precipitando normalmente após vários anos de envelhecimento do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

5. Sobressaturação e cristalização dos sais tartáricos

A cristalização do bitartarato de potássio e do tartarato de cálcio está dependente do equilíbrio sólido-líquido, dos iões potássio e cálcio com o ácido L(+)-tartárico. A sobressaturação destes sais, causada pela elevada concentração dos iões anteriormente referidos, faz com que exista o risco da sua cristalização, sendo que quanto mais alta for a sobressaturação, mais rápida será a taxa de cristalização (Gerbaud *et al.*, 2010).

O bitartarato de potássio e o tartarato de cálcio são sais cuja solubilidade diminui com a formação de etanol durante a fermentação, e com a diminuição da temperatura, que acontece muito em vinhos colocados no frigorífico, principalmente nos brancos (Corti e Paladino, 2016). A diminuição da solubilidade destes sais, faz com que estes possam atingir um estado de sobressaturação e posteriormente, cristalizar (Coulter *et al.*, 2015).

Tabela 1. Solubilidade do bitartarato de potássio (g/L) em soluções modelo (Boulton *et al.*, 1999)

Temperatura (°C)	Teor Alcoólico (%v/v)			
	0	10	12	14
0	2.25	1.26	1.11	0.98
5	2.66	1.58	1.49	1.24
10	3.42	2.02	1.81	1.63
15	4.17	2.45	2.25	2.03
20	4.92	3.08	2.77	2.51

Como se pode verificar na tabela 1, a solubilidade do bitartarato de potássio diminui com o aumento do teor alcoólico e, pelo contrário, é tanto maior quanto mais elevada for a temperatura.

Também o pH do vinho é outro fator importante e que influencia a solubilidade destes sais, sabendo-se que à medida que aumenta, menor é o teor em ácido tartárico e maior é a percentagem de bitartarato de potássio e de tartarato, o que aumenta o risco da precipitação destes sais (Margalit, 2012). Na tabela 2, é possível observar-se que no intervalo de valores normais de pH do vinho (entre 2,8 e 4,0), quanto maior o pH, maior é a percentagem destes iões.

Tabela 2. Percentagem de ácido tartárico e dos seus iões em função do pH (Boulton *et al.*, 1999).

pH	% Ácido Tartárico	% ião bitartarato	% ião tartarato
2.8	66.6	32.8	0.55
3.0	55.5	43.3	1.15
3.2	43.7	54.0	2.28
3.4	32.4	63.4	4.24
3.6	22.6	70.0	7.43
3.8	14.8	72.9	12.26
4.0	9.19	71.7	19.1
4.2	5.38	66.5	28.1

De facto, os principais fatores que afetam a solubilidade dos sais tartáricos são a temperatura, o pH e o teor alcoólico da solução em que se encontram, afetando por isso a estabilidade tartárica dos vinhos.

No que diz respeito à solubilidade dos sais e ao risco da sua precipitação, existem dois conceitos importantes: o produto de concentração e o produto de solubilidade.

O produto de concentração (PC) do THK é obtido pela multiplicação das concentrações molares reais dos seus iões em solução (Lasanta e Gómez, 2012) e é expresso por:

$$PC = [HT^-]_r [K^+]_r$$

onde r expressa a concentração atual, real, das espécies em solução (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Já o produto de solubilidade (PS), representa a concentração máxima de uma espécie, a uma determinada temperatura e pressão, para que a solução onde se encontra esteja em equilíbrio termodinâmico com a fase sólida, neste caso com o THK. Nesta situação diz-se que a solução está saturada (Coulter *et al.*, 2015). O produto de solubilidade é definido pela seguinte equação:

$$PS = [HT^-]_e [K^+]_e$$

onde (e) se define pela concentração de equilíbrio das espécies (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Por outras palavras, o PS é o produto da concentração dos iões em solução, quando o sal está na sua concentração máxima e, portanto, está saturado na solução (Margalit, 2012).

Em relação ao bitartarato de potássio, quando o seu produto de concentração (PC) é inferior ao produto de solubilidade (PS), a solução não está saturada e não existe o risco de precipitação do THK. A saturação da solução em THK ocorre quando o produto de concentração (PC) iguala o produto de solubilidade (PS). Porém, o risco de precipitação deste sal existe quando o produto concentração (PC) é superior ao produto de solubilidade (PS) e, portanto, a solução está num estado de sobressaturação, o que pode levar à cristalização do bitartarato de potássio (Coulter *et al.*, 2015).

Na situação em que o PC é superior ao PS, qualquer alteração nas condições da solução, por mais pequena que seja, pode provocar a precipitação e a cristalização do bitartarato de potássio. Os fatores que mais podem contribuir para isso são alterações de temperatura, teor alcoólico e pH do vinho (Margalit, 2012).

No vinho, frequentemente a concentração do bitartarato de potássio é superior à sua solubilidade, isto é, o produto de concentração (PC) deste sal é superior ao seu produto de solubilidade (PS) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

O produto de solubilidade e o produto de concentração podem ser calculados para qualquer sal, e o princípio é o mesmo do referido para o bitartarato de potássio. Basta substituir nas fórmulas as concentrações dos iões que constituem o sal pretendido (Margalit, 2012).

Normalmente, fala-se em cristalização dos sais do ácido tartárico em vez de precipitação, uma vez que a taxa de nucleação e de crescimento dos cristais é moderada, ao contrário dos sais que precipitam realmente e que ficam com um aspeto de cristal quase imediato (Gerbaud *et al.*, 2010).

A condição de sobressaturação não é suficiente para que haja cristalização do bitartarato de potássio, é também necessário existirem corpos sólidos em solução, que funcionem como núcleos, que sejam o centro da cristalização, a partir dos quais os cristais se desenvolvem (Coulter *et al.*, 2015). Uma vez que o núcleo esteja formado, este inicia o seu crescimento, originando cristais que podem ser visíveis. Muitos estudos demonstram que a taxa de cristalização é influenciada não só pelo grau de sobressaturação, como também pela quantidade de núcleos de cristalização que existem (Rayess *et al.*, 2016).

Para que se inicie o processo de cristalização num vinho a nucleação tem de ocorrer, podendo esta ser de dois tipos. Pode ser primária, que é aquela que acontece espontaneamente e que origina cristais de maiores dimensões devido ao seu crescimento ser mais lento, e pode ser secundária, que é mais rápida que a primária, e ocorre quando é induzida pela adição de finos cristais de tartaratos, que atuam como núcleos, provocando o aumento da sobressaturação, para além de diminuírem o tempo que decorre entre a sobressaturação e a cristalização (Rayess *et al.*, 2016).

Outro conceito importante que diz respeito a este tema, é o tempo de indução. Este define-se como o tempo que decorre entre a sobressaturação da solução em sais do ácido tartárico e o aparecimento dos cristais e é inversamente proporcional à taxa de nucleação. (Coulter *et al.*, 2015, Bajul *et al.*, 2017).

Este tempo é influenciado por fatores tais como o grau de sobressaturação, a agitação e a presença de impurezas. Graus de sobressaturação superiores levam a tempos de indução inferiores (Coulter *et al.*,

2015). A presença de impurezas ou de núcleos de cristalização podem reduzir o tempo de indução, ao induzirem a nucleação secundária como já foi anteriormente referido, sendo que esta ocorre de uma forma muito mais rápida que uma primária (Bajul *et al.*, 2017).

Os núcleos correspondem à formação de um pequeno cristal na fase líquida, criando uma interface entre esta e a fase sólida, a partir da qual se dá o crescimento do cristal (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

A fase do crescimento dos cristais de THK é descrita por alguns autores como um crescimento camada por camada devido à absorção de iões e moléculas da solução, nomeadamente os iões HT^- e K^+ , pela face do cristal. Sugere-se que ocorre a ligação destas moléculas às outras que já estão ligadas ao cristal em formação, e que após uma camada estar completa, o crescimento de uma nova acima desta é iniciado, e assim sucessivamente. Apesar disso, a cristalização não é assim tão linear, ocorrendo a ligação e o desprendimento constante de moléculas das superfícies das camadas formadas, criando locais com falhas, que levam a que a forma dos cristais não seja regular (Coulter *et al.*, 2015).

No processo do crescimento dos cristais, as espécies em solução, são transportadas para a superfície do cristal por difusão. Ocorre então a migração dos iões para aí, onde são integrados na estrutura do cristal, nos locais em que existam forças atrativas (Rayess *et al.*, 2016).

A carga positiva dos cristais de bitartarato de potássio é criada pela tendência de existirem mais iões de potássio do que de bitartarato (Jackson, 2000).

6. Fatores que influenciam o processo de cristalização

A precipitação do bitartarato de potássio depende de vários fatores como o teor alcoólico, a temperatura e o pH, uma vez que estes influenciam a solubilidade deste sal, como já foi descrito. Para além disso a sua precipitação também é influenciada pelo teor em coloides protetores e pela presença de núcleos de cristalização no vinho (Santos *et al.*, 2000).

Como foi anteriormente referido, não basta haver sobressaturação para que ocorra cristalização. Os núcleos de cristalização são necessários para que os cristais se possam desenvolver a partir deles, atuando como núcleos, a partir dos quais os cristais iniciam o seu crescimento (Coulter *et al.*, 2015).

Os coloides protetores, macromoléculas que existem naturalmente no vinho, impedem o crescimento dos núcleos de cristalização e o crescimento dos cristais de THK. Estes coloides podem ser proteínas, taninos condensados e polissacáridos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Alguns dos coloides protetores existentes naturalmente no vinho, como é o caso das manoproteínas, têm carga negativa, sendo atraídos pelas cargas positivas das superfícies dos cristais de bitartarato de potássio, bloqueando o crescimento destes. Para além disso, o crescimento dos cristais também pode ser atrasado pela ligação de iões de bitartarato a proteínas carregadas positivamente, uma vez que isso reduz o bitartarato livre, e conseqüentemente a taxa de cristalização (Jackson, 2000).

Também se sabe que os vinhos tintos têm um teor em compostos fenólicos muito superior aos vinhos brancos, sendo que os seus taninos condensados, carregados negativamente ao pH do vinho, têm um forte efeito inibitório da cristalização dos tartaratos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). De facto, tanto os iões de potássio como de bitartarato podem ligar-se a estes taninos, o que faz com que a cristalização tenda a atrasar-se mais em vinhos tintos quem em vinhos brancos. A ligação de sulfitos ao potássio é outra das causas do atraso da estabilização do bitartarato (Jackson, 2000).

7. Testes de avaliação da estabilidade tartárica

Os testes mais utilizados para determinar a estabilidade tartárica dos vinhos são o teste por refrigeração e os testes baseados na condutividade elétrica dos vinhos, nomeadamente o teste do mini contacto e o da temperatura de saturação. De seguida serão abordados cada um deles detalhadamente.

7.1. Teste por refrigeração

Trata-se de um teste tradicional e empírico, no qual se utiliza 100 mL de amostra do vinho que se pretende verificar a estabilidade tartárica, e que é colocada num refrigerador a 0°C, durante 4 a 6 dias. No final desse período, por observação visual, verifica-se se existem cristais na amostra (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), caso existam, o vinho está instável do ponto de vista tartárico (Boulton *et al.*, 1999).

Por oposição, a ausência de cristais significa que existe estabilidade tartárica (Boulton *et al.*, 1999).

As principais vantagens deste teste são a facilidade da sua realização e a sua simplicidade, bem como, o facto de não ser necessário nenhum tipo de equipamento específico, a não ser um refrigerador, para que seja posto em prática (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Apesar disso, é um teste pouco preciso e que não indica o grau de instabilidade do vinho. É um teste apenas qualitativo, apenas informando se o vinho se encontra tartaricamente estável ou não (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Não se trata de um teste que seja recomendado uma vez que pode originar falsos resultados. Isto acontece quando vinhos instáveis, com uma sobressaturação baixa, desenvolvem os cristais tartárico muito lentamente, não havendo tempo suficiente com este teste para que eles se desenvolvam e para que sejam observados. Assim vinhos que não estão estáveis podem aparentar estar no final do teste, o que leva nestas situações, a uma incorreta interpretação dos resultados (Boulton *et al.*, 1999).

Outro ponto negativo do teste por refrigeração é o facto de ser muito demorado, dado basear-se na nucleação espontânea, isto é, não induzida, não oferecendo resultados rápidos como se deseja (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

7.2. Teste do mini contacto

O teste do mini contacto consiste na medição da variação da condutividade elétrica (ΔS) do vinho, mantido a 0°C em agitação durante um

período de tempo, após a adição de cristais de bitartarato de potássio (Bosso *et al.*, 2010).

Neste teste adiciona-se 4 g/L de bitartarato de potássio à amostra de vinho a que se pretende efetuar o teste, de forma a provocar uma nucleação induzida, que é mais rápida que a nucleação primária (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A presença de cristais de THK ao induzir a nucleação, leva à precipitação do bitartarato de potássio, que é depois quantificada pela medição da condutividade elétrica, sendo que esta é diretamente proporcional à quantidade de iões, nomeadamente de potássio, que existem no vinho. No final do teste obtém-se um gráfico da condutividade em função do tempo, no qual se consegue medir o decréscimo de condutividade do vinho, e com esse valor sabe-se se o vinho está estável ou se existe risco de precipitação do bitartarato de potássio (Lasanta e Gómez, 2012).

A cristalização do bitartarato de potássio é monitorizada pela alteração da condutividade do vinho provocada essencialmente pela perda de iões de potássio livres na solução quando a cristalização ocorre. As unidades que expressam a condutividade elétrica são S/cm, sendo S (Siemen) a unidade da condutância (Boulton *et al.*, 1999).

De acordo com a literatura considera-se que existe um risco de precipitação de bitartarato de potássio elevado quando o decréscimo de condutividade é superior a 40-45 S/cm, e que este risco é baixo quando esta diminuição é inferior a 20-25 S/cm (Lasanta e Gómez, 2012).

Há que ter em atenção que o teste do mini contacto define a estabilidade do vinho à temperatura de 0°C e no estado coloidal em que se encontra nesse momento, não tendo em consideração a reorganização coloidal que acontece durante o envelhecimento dos vinhos, principalmente nos tintos, e que leva à perda do efeito de coloide protetor por parte de alguns fenóis, e à precipitação da matéria corante a que muitas vezes se encontram associados cristais de THK (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

7.3. Determinação da temperatura de saturação

A temperatura de saturação define-se como a temperatura mais baixa do vinho a que o bitartarato de potássio se consegue dissolver (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Antes da estabilização tartárica muitos vinhos estão sobressaturados, ou seja, a sua temperatura de saturação é superior à sua temperatura atual, havendo risco de cristalização dos tartaratos (Gerbaud *et al.*, 2010).

Nos vinhos esta temperatura pode ser utilizada como um indicador da estabilidade tartárica, determinando-se através da medição da condutividade elétrica do vinho, sendo que baixos valores de temperatura de saturação significam elevada estabilidade. Isto porque quando estes valores são baixos, é necessária haver uma diminuição superior da temperatura do vinho para que este fique abaixo da temperatura de saturação, havendo assim um menor risco de isso acontecer do que no caso em que a temperatura ambiente se encontra próxima da temperatura de saturação (Lasanta e Gómez, 2012).

A determinação da temperatura de saturação faz-se através da medição da condutividade elétrica de duas amostras de vinho, uma de controlo e outra a que se adicionou bitartarato de potássio, durante um ciclo de aumentos de temperatura, sendo a temperatura de saturação a temperatura que se verifica quando a condutividade elétrica das duas amostras se iguala (Cabrita *et al.*, 2016).

A utilização deste método tem, contudo, algumas desvantagens uma vez que por vezes a temperatura de saturação determinada, não corresponde à verdadeira temperatura de estabilidade do vinho, podendo haver alguns graus de diferença entre elas. Isto pode acontecer pela presença de inibidores da cristalização, nomeadamente coloides protetores (Lasanta e Gómez, 2012).

8. Tratamentos para alcançar a estabilidade tartárica

Existem dois tipos de estabilização tartárica que podem ser utilizados nos vinhos, a física e a química. A estabilização física, através do frio, provoca a precipitação dos sais do ácido tartárico de forma a que se elimine a sua sobressaturação, sendo a técnica mais antiga e a mais utilizada. Já a estabilização química, utiliza aditivos que inibem a precipitação destes sais

durante um certo período de tempo. Existe ainda a possibilidade de se recorrer à eletrodialise e a resinas de troca iónica, consideradas também métodos físicos que eliminam iões do vinho (Simões *et al.*, 2013; Corti e Paladino, 2016). A eletrodialise implica um elevado investimento inicial pelo custo de aquisição do equipamento necessário à sua realização, e a utilização de resinas de troca iónica não é aconselhada em vinhos com um elevado teor em ácido tartárico (Triulzi *et al.*, 2015).

Gerbaud *et al.* (2010) refere-se a 3 métodos que existem para prevenir a cristalização dos sais do ácido tartárico em vinhos engarrafados, explicando que existem processos que induzem a precipitação dos sais antes do engarrafamento através da refrigeração do vinho; processos que removem seletivamente os iões de potássio e de cálcio, através da eletrodialise e de resinas de troca iónica; e por fim, a utilização de inibidores da cristalização, utilizando-se aditivos como o ácido metatartárico, a carboximetilcelulose e manoproteínas de leveduras.

O poliaspartato de potássio é o mais recente aditivo que pode ser utilizado em enologia na estabilização tartárica dos vinhos, como inibidor de cristalização.

De seguida serão abordadas as diferentes formas de estabilização tartárica com mais detalhe.

8.1. Estabilização pelo frio

É uma das técnicas mais utilizadas na estabilização dos vinhos e das mais antigas, apesar de ser muito dispendiosa em termos de tempo e de energia elétrica (Lasanta e Gómez, 2012).

Neste tipo de estabilização, os vinhos são arrefecidos a uma temperatura próxima do seu ponto de congelação, uma vez que o frio diminui a solubilidade dos sais tartáricos, nomeadamente do bitartarato de potássio, levando à sua cristalização (Jackson, 2000). Esta temperatura deve estar abaixo da temperatura de cristalização do bitartarato de potássio, mas acima da temperatura de congelação do vinho (Santos *et al.*, 2000).

A temperatura de estabilização a ser utilizada pode ser estimada através da seguinte fórmula (Jackson, 2000):

$$\text{Temperatura (- }^{\circ}\text{C)} = (\% \text{ álcool do vinho } \div 2) - 1$$

Durante a estabilização a frio, a agitação das cubas é importante para homogeneizar a temperatura e para facilitar a nucleação (Corti e Paladino, 2016).

Na estabilização tradicional pelo frio, o vinho é arrefecido a temperaturas entre os -4 e os 0°C, mantendo-se assim por vários dias ou semanas, induzindo-se uma nucleação espontânea para que ocorra o processo de cristalização dos sais tartáricos. Trata-se de um processo demorado e que forma cristais de grande dimensão devido ao seu crescimento ocorrer lentamente (Coulter *et al.*, 2015). O tempo para que o vinho fique estável é variável, porém este é um método de longa duração podendo demorar cerca de 7 a 12 dias em vinhos brancos e algumas semanas em vinhos tintos (Sanz, 2012). Para além de ser demorado é difícil de prever quanto tempo é que os vinhos necessitam de estar neste processo para que fiquem bem estabilizados (Coulter *et al.*, 2015).

Neste tipo estabilização, a remoção de iões de cálcio é muito pequena, não resolvendo o problema do tartarato de cálcio e, para além disso, elimina potássio pela precipitação do bitartarato de potássio e diminui a acidez do vinho ao diminuir o teor em ácido tartárico (perdem-se 2 unidades de ácido tartárico por cada unidade de ião potássio eliminada) (Corti e Paladino, 2016).

Cabrita *et al.* (2016), referem que a estabilização tradicional pelo frio não é eficiente para o tartarato de cálcio, leva a perdas significativas de vinho que são descarregadas juntamente com o precipitado de bitartarato de potássio, e leva a uma diminuição da intensidade da cor devida à precipitação parcial de polifenóis em conjunto com os sais de bitartarato de potássio.

Para aumentar a eficiência do tratamento pelo frio, existe um outro método designado método por contacto, no qual são adicionados finos cristais de bitartarato de potássio ao vinho, que atuam como núcleos de cristalização. Isto permite aumentar a temperatura a que se realiza o tratamento para 0-1°C e reduzir a sua duração, utilizando-se uma dose de THK de 4 g/L, com agitação

constante para uma completa homogeneização no vinho (Lasanta e Gómez, 2012).

O método por contacto é muito mais rápido que o tradicional, acontecendo por nucleação secundária, induzida pela adição dos pequenos cristais de tartaratos. Tem a vantagem de reduzir o tempo do tratamento para 4 horas, e por vezes até menos em vinhos brancos. Para além disso também reduz os gastos energéticos já que os vinhos são refrigerados a temperaturas mais altas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). É um método que permite reduzir o tempo de indução (Coulter *et al.*, 2015).

No método por contacto também se podem adicionar cristais de tartarato de cálcio, o que faz com que, ao contrário do tratamento pelo frio tradicional, este método seja eficiente a reduzir a concentração de cálcio e ao mesmo tempo induzir a precipitação do bitartarato de potássio, apesar desta forma ser mais cara e com uma duração entre 2 a 7 dias (Lasanta e Gómez, 2012).

A adição de cristais de tartarato de cálcio consegue inibir a cristalização deste sal e do bitartarato de potássio, enquanto que a adição cristais de bitartarato de potássio apenas inibe a cristalização deste, não reduzindo os níveis de cálcio (Sanz, 2012).

No final do tratamento pelo frio, o vinho tem de ser filtrado para que os cristais formados sejam eliminados, sendo que a filtração deve ser realizada a frio para que os cristais não se voltem a dissolver no vinho (Sanz, 2012).

A estabilização pelo frio para além de cara, pode ser ineficiente quando a sobressaturação do vinho em sais tartáricos é muito baixa, ou nos vinhos tintos quando a matéria coloidal impede a nucleação e o crescimento dos cristais (Gerbaud *et al.*, 2010). Outro inconveniente é o facto da limpeza das cubas onde o tratamento foi feito ser difícil e de custo elevado (Corti e Paladino, 2016).

Também a dificuldade em encontrar a temperatura e o tempo ótimo a que o vinho deve ser sujeito para ficar bem estabilizado, tal como, a dificuldade em decidir-se se faz a adição ou não dos núcleos de cristalização e qual a sua granulometria e quantidade a aplicar, tem feito muitos enólogos optar por outros métodos (Santos *et al.*, 2000).

8.2. Utilização de aditivos

Os aditivos enológicos utilizados na estabilização tartárica atuam como colóides protetores, cobrindo a superfície dos cristais e prevenindo o seu crescimento (Sprenger *et al.*, 2015). Estes aditivos, afetam a morfologia dos cristais tartáricos ao conseguirem absorver partes destes, pela absorção de moléculas da sua superfície, e desta forma atrasam ou impedem o seu crescimento (Coulter *et al.*, 2015). Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), os aditivos utilizados para prevenir a precipitação tartárica, podem inibir a formação dos cristais ou modificar as suas propriedades, tornando-os solúveis a baixa temperatura.

O seu efeito depende também da concentração utilizada à temperatura a que o vinho se encontra (Gerbaud *et al.*, 2010).

A utilização de aditivos tem vantagens relacionadas com o facto de não terem custos energéticos associados, e de não ser necessário um investimento inicial em equipamentos para a sua utilização (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Atualmente os aditivos enológicos autorizados pela legislação europeia para a instabilidade tartárica são o ácido metatartárico, a carboximetilcelulose e as manoproteínas, sendo que algumas gomas arábicas também podem ser utilizadas (Triulzi *et al.*, 2015). Mais recentemente foi também autorizado o poliaspartato de potássio para este fim.

Cada um dos aditivos autorizados tem as suas limitações. O ácido metatartárico tem uma excelente ação estabilizadora sobre todos os tipos de vinho, no entanto, é muito instável ao longo do tempo, perdendo a sua eficácia depois de alguns meses. As carboximetilceluloses têm uma capacidade de estabilização ligeiramente inferior à do ácido metatartárico e quando adicionadas aos vinhos tintos podem causar instabilidade da cor. Já as manoproteínas, têm um efeito variável dependendo do tipo de vinho e é sempre aconselhável realizar testes preliminares para verificar sua eficácia e para se determinar a dose ideal a utilizar (Bosso, 2015).

De seguida cada um dos aditivos autorizados em Portugal para prevenir a estabilidade tartárica será abordado, referindo-se também as suas vantagens e desvantagens.

8.2.1. Manoproteínas

As manoproteínas são glicoproteínas que fazem parte das paredes das células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que podem ser encontradas naturalmente no vinho, devido à sua libertação pelas leveduras durante a fermentação, e durante o envelhecimento de vinhos sobre borras, pela autólise das leveduras que nelas se encontram (Lasanta e Gómez, 2012). As manoproteínas fazem parte de um dos maiores grupos de polissacáridos existente no vinho e conseguem inibir a cristalização dos sais do ácido tartárico, previnem as casses proteicas, interagem com compostos fenólicos e diminuem a adstringência dos vinhos tintos. Para além disso permitem também melhorar certos aromas do vinho, bem como, o crescimento das bactérias lácticas (Rodrigues *et al.*, 2012).

As manoproteínas localizam-se na camada externa das paredes das leveduras (figura 3), onde se encontram ligadas por ligações covalentes a uma matriz de β -1,3-glucanos, e as suas estruturas moleculares consistem numa cadeia peptídica, ligada a unidades de D-manose (Cabrita *et al.*, 2016). Na sua composição 10 a 20% são proteínas e 80 a 90% é D-manose, ligada a resíduos de D-glucose e N-acetilglucosamina. Ao pH do vinho podem apresentar carga negativa e a densidade da carga é dependente da quantidade de grupos fosfato, sendo devida a essa carga que se consegue criar interações eletrostáticas e iónicas com outros componentes do vinho, nomeadamente com os cristais de bitartarato de potássio (Rodrigues *et al.*, 2012).

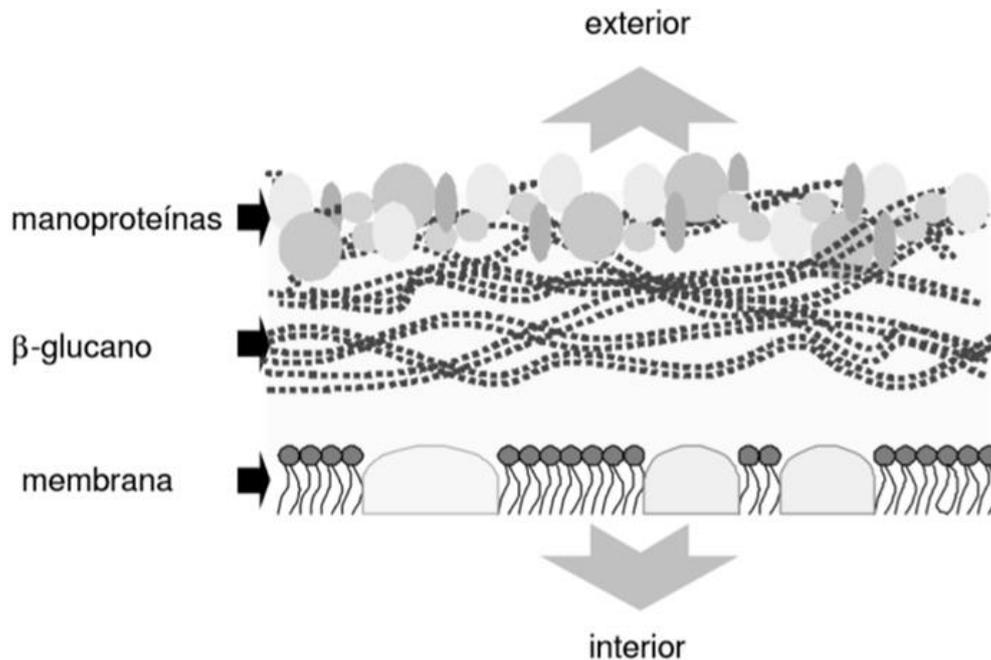


Figura 3. Localização das manoproteínas nas paredes das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Dubourdieu e Moine-Ledoux, 2007).

É de referir que as manoproteínas naturalmente presentes nos vinhos funcionam como coloides protetores, com um efeito estabilizante, tanto no que diz respeito a precipitações proteicas como a precipitações tartáricas, sendo por isso que os vinhos envelhecidos sobre borras melhoram a sua estabilidade de uma forma natural (Dubourdieu e Moine-Ledoux, 2007). A concentração de manoproteínas nos vinhos depende da tecnologia utilizada na produção destes, porém existem naturalmente numa quantidade significativa, especialmente em vinhos tintos (Cabrita *et al.*, 2016).

As manoproteínas são inibidores naturais da cristalização do bitartarato de potássio e afetam a taxa de crescimento dos cristais ao se ligarem a pontos de nucleação, prevenindo a expansão da sua estrutura (Lasanta e Gómez, 2012). Apesar disso, o seu papel sobre o crescimento dos cristais é menos relevante que o seu efeito na inibição da nucleação dos cristais, que acontece na primeira etapa da formação destes, sendo que por esse motivo, o seu efeito só é garantido ainda na ausência de cristais no vinho (Sanz, 2012).

As manoproteínas podem também ser adicionadas ao vinho através de preparações comerciais, com objetivo de aumentar o volume de boca, bem como, de se alcançar a estabilidade tartárica dos vinhos (Lasanta e Gómez, 2012; Coulter *et al.*, 2015). Isto porque as manoproteínas cedidas pelas leveduras à concentração que normalmente se encontram no vinho apenas conseguem retardar cristalização dos sais tartáricos, porém não conseguem inibir de forma total a cristalização, sendo que para isso, é necessário a adição de manoproteínas exógenas para que se atinja uma estabilidade total (Dubourdieu e Moine-Ledoux, 2007).

Apesar disso, os vinhos que envelheceram sobre borras são mais estáveis tartaricamente e podem não necessitar de tratamento a esse nível (Sanz, 2012). Envelhecer vinhos brancos sobre borras por alguns meses, geralmente dá uma estabilidade ao vinho elevada, o que demonstra a importância das manoproteínas obtidas por autólise das leveduras (Cabrita *et al.*, 2016).

Em relação às manoproteínas comerciais, existem dois tipos de métodos industriais para a sua extração das leveduras, podendo ser por via química ou por via enzimática. A via química faz-se pela extração de manoproteínas a quente num meio tamponado (Dubourdieu e Moine-Ledoux, 2007). Pela via enzimática as manoproteínas são obtidas pela digestão enzimática das paredes celulares das leveduras com uma preparação industrial de β -(1-3) e β -(1-6) glucanases, permitidas em enologia como enzimas clarificantes para melhorar a filtrabilidade dos vinhos, produzidas a partir de uvas com *Botrytis* (Cabrita *et al.*, 2016). Descobriu-se que as manoproteínas extraídas das paredes das leveduras por tratamento enzimático, têm um efeito inibidor da cristalização tartárica, ao contrário das obtidas por via química (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A utilização de manoproteínas obtidas pela hidrólise enzimática das paredes celulares das leveduras foi autorizado em 2005 pela comunidade europeia. Mais tarde, em 2008 o OIV autorizou o seu uso em vinhos brancos e em vinhos espumantes (Bosso *et al.*, 2010).

Em vinhos tintos, as manoproteínas conseguem interagir com taninos e outros compostos fenólicos, havendo estudos que revelaram que a sua adição

no início da vinificação pode diminuir a estabilidade e a intensidade da cor (Coulter *et al.*, 2015).

As manoproteínas são inibidoras eficientes da precipitação tartárica numa concentração de 200 mg/L em alguns vinhos, porém quando estes têm níveis de saturação de sais tartáricos muito elevados, a quantidade a que são necessárias para terem o mesmo efeito inibitório é elevada, podendo levar à sua floculação e não ter o efeito desejado (Gerbaud *et al.*, 2010).

Como as manoproteínas também contribuem para melhorar a qualidade sensorial dos vinhos e são compostos que aí se encontram naturalmente, ao contrário da carboximetilcelulose e do ácido metatartárico, são melhor aceites e entendidas que os outros aditivos (Cabrita *et al.*, 2016).

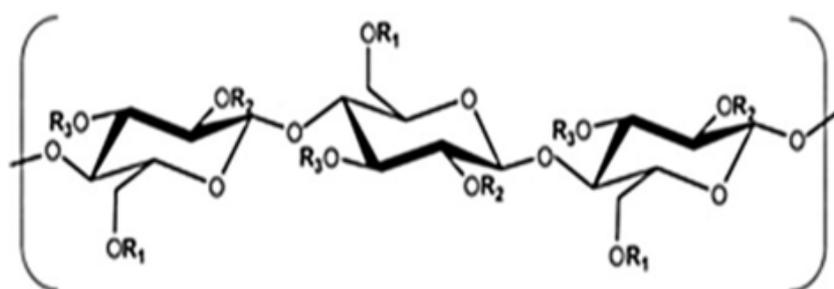
8.2.2. Carboximetilceluloses

As carboximetilceluloses, também conhecidas por CMC's, foram autorizadas como produto enológico para prevenir a precipitação tartárica pelo OIV em 2009, com uma dose máxima de 100 mg/L (Bajul *et al.*, 2017). Antes disso já eram utilizadas na indústria alimentar como um aditivo conhecido por E466 (Guise *et al.*, 2014).

Trata-se de um derivado da celulose, completamente neutro a nível organolético e muito eficaz a estabilizar vinhos contra a precipitação do bitartarato de potássio (Sanz, 2012). Sem efeitos prejudiciais à saúde, este composto é produzido pela reação de uma pasta alcalina de celulose num solvente orgânico, com o ácido monocloroacético ou com o seu sal de sódio. Nesta reação, os átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo (-OH) das unidades de glicose da celulose, são substituídos por grupos carboximetil de sódio (-CH₂COONa) (Coulter *et al.*, 2015).

As carboximetilceluloses podem ter diferentes graus de substituição (número de grupos hidroxilo substituídos por grupos carboxilo (-COO⁻), em relação ao número total de unidades de glucose), e diferentes graus de polimerização, que tem a ver com o comprimento da cadeia, e que é o número médio de unidades de glucose no polímero (Guise *et al.*, 2014). Como só existem

três grupos hidroxilo disponíveis para reagir com o grupo substituinte carboximetilo por cada unidade de glucose, o grau de substituição máximo é 3. Por exemplo, quando numa unidade de glucose apenas um grupo hidroxilo é substituído por um grupo carboximetilo, a estrutura é representativa de uma CMC com um grau de substituição igual a 1. Por outro lado, quando os três grupos hidroxilo são substituídos pelo grupo carboximetilo, a estrutura é de uma CMC com um grau de substituição igual a 3 (Coulter *et al.*, 2015) (figura 4).



Celulose: R1 = R2 = R3 = H

Carboximetilcelulose:

- grau de substituição = 1: R1= CH₂COOH; R2 e R3 = H
- grau de substituição = 3: R1 = R2 = R3 = CH₂COOH

Figura 4. Estrutura da celulose e da carboximetilcelulose (Coulter *et al.*, 2015).

Para um dado grau de polimerização, quanto maior for o grau de substituição, mais locais de fixação de catiões vai ter a CMC, e maior vai ser a sua eficiência como colóide protetor (Guise *et al.*, 2014). As alterações no grau de substituição levam a alterações na distribuição de carga da CMC, o que tem influência na sua interação com o crescimento dos cristais de bitartarato de potássio, e conseqüentemente, na sua eficácia na estabilidade tartárica (Coulter *et al.*, 2015). Segundo Bosso *et al.* (2010), o seu efeito estabilizante é superior quando têm maior peso molecular e maior grau de substituição.

Em vinhos com uma elevada instabilidade tartárica, associada a uma elevada concentração de potássio e de ácido tartárico, a utilização de uma CMC com um grau de substituição elevado pode ser uma vantagem (Guise *et al.*, 2014).

O grau de polimerização influencia a viscosidade e a solubilidade das CMC's, sendo que elevadas viscosidade dificultam a sua preparação e a sua mistura no vinho. A sua eficácia também é menor caso tenha baixa solubilidade, já que isso impede a sua total dissolução no vinho (Coulter *et al.*, 2015). Quanto mais baixo o grau de polimerização da CMC, melhor é a sua eficácia (Bajul *et al.*, 2017).

Além do efeito do grau de substituição e do grau de polimerização, a eficácia das CMC's na inibição da precipitação do bitartarato de potássio também depende da matriz do vinho (Coulter *et al.*, 2015).

O pH do vinho afeta a inibição do THK pela CMC uma vez que afeta a dissociação desta e o seu número de cargas -COO^- (Bajul *et al.*, 2017).

Os grupos carboxilo (-COO^-) das CMC's estão carregados negativamente ao pH do vinho, o que faz com que sejam atraídos pela superfície dos cristais de bitartarato de potássio, que é carregada positivamente uma vez que é coberta essencialmente por iões K^+ , formando uma camada absorvente que inibe o seu crescimento (Coulter *et al.*, 2015). Uma CMC ao ser adsorvida pela superfície dos cristais consegue bloquear locais específicos de crescimento, diminuindo o crescimento nesses locais, e conseqüentemente reduz o tamanho dos cristais e altera a sua morfologia (Bajul *et al.*, 2017) (figura 5).

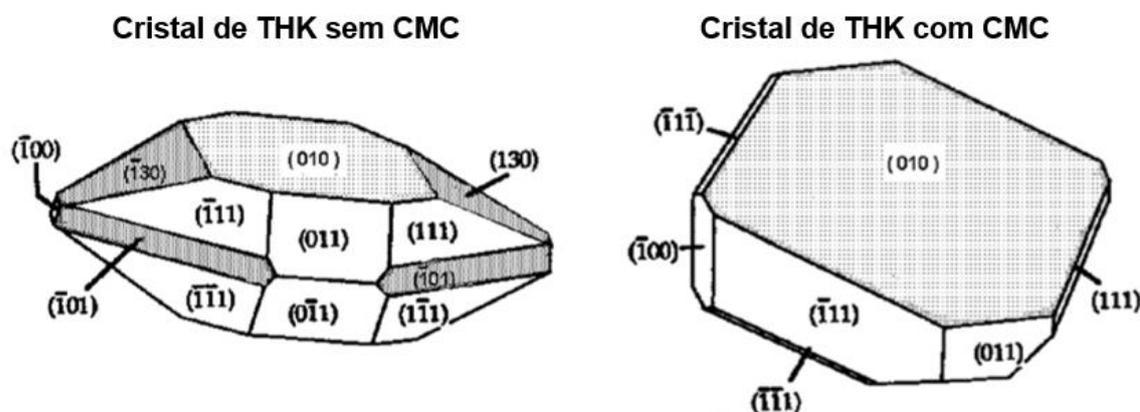


Figura 5. Morfologia dos cristais de bitartarato de potássio sem e com a adição de uma CMC ao vinho (Gerbaud *et al.*, 2010).

Para além disso, pela sua carga negativa, as CMC's atraem os iões K^+ que existem em solução, diminuindo a quantidade que existe disponível para ser absorvida durante a cristalização, e também conseguem repelir os iões H^+ em solução que esperam ser incorporados na rede cristalina, através dos seus grupos $-COO^-$ (Coulter *et al.*, 2015).

As carboximetilceluloses são compostos muito estáveis e que mantêm o seu efeito inibitório em vinhos aquecidos a $30^\circ C$ durante 8 dias, ao contrário do ácido metatartárico que se hidrolisa nestas condições. Apesar disso, em vinhos tintos são menos eficientes e interagem com antocianinas, gerando turbidez e alterações na cor, o que faz com que o seu uso seja limitado a vinhos brancos (Lasanta e Gómez, 2012). Quanto mais rico for o vinho em polifenóis, maior é o risco de aumentar a turbidez (Sanz, 2012).

O OIV (2019) recomenda o uso de CMC's em vinhos brancos e espumantes com objetivo de contribuir para a estabilidade tartárica. Deve ser adicionada ao vinho depois deste ser filtrado e tem um efeito estabilizante com uma duração de pelo menos de 4 anos, sendo uma boa alternativa, com mais vantagens que o ácido metatartárico que se hidrolisa ao longo do tempo (Sanz, 2012).

8.2.3. Ácido metatartárico

O ácido metatartárico é um poliéster resultante da esterificação intermolecular do ácido tartárico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) (figura 6). Esta reação ocorre entre duas moléculas de ácido tartárico através da formação de ligações éster entre o grupo ácido de uma e o grupo álcool da outra, originando uma substância polimerizada (Morello, 2012). Este processo ocorre sob condições controladas, com temperaturas entre 150 e $170^\circ C$, sob vácuo, formando uma massa castanha amarelada sem estrutura química definida. Esta massa é triturada de forma a que se obtenha pequenas partículas, para que possam ser utilizadas como agentes estabilizantes (Sprenger *et al.*, 2015). Para utilização enológica a sua taxa de esterificação mínima, estabelecida pelo OIV pelo Codex Enológico Internacional, é de 32% (Cabrita *et al.*, 2016).



Figura 6. Esterificação do ácido tartárico que dá origem ao ácido metatartárico (Morello, 2012).

O ácido metatartárico não é um composto simples, mas sim uma mistura de polímeros com diferentes pesos moleculares. Existem várias preparações de ácido metatartárico disponíveis, com diferentes propriedades anti cristalizantes, dependendo da taxa de esterificação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esta mistura de diferentes polímeros, tem como constituintes primários o monoéster e diéster ditartárico em proporções variáveis, misturados com quantidades variáveis de ácido tartárico não esterificado, ácido pirúvico e pequenas quantidades de ácidos poliéster pouco conhecidos (Cabrita *et al.*, 2016).

Este ácido tem uma elevada solubilidade em água e em álcool, sendo rapidamente hidrolisado em solução aquosa a 100°C. Para além disso, deve ser conservado em condições secas uma vez que é muito higroscópico (Cabrita *et al.*, 2016).

A sua eficiência depende do seu grau de esterificação sendo que quanto maior este for, mais eficiente é o produto (Lasanta e Gómez, 2012). É possível dividir as preparações de ácido metatartárico em 3 grupos: um com uma taxa de esterificação entre 40 e 36%, outro entre 35 e 30% e outro abaixo de 30%, tendo estes, respetivamente, uma eficiência na estabilização tartárica, elevada, média e insuficiente (Morello, 2012).

O ácido metatartárico é utilizado na estabilização tartárica dos vinhos uma vez que impede o crescimento dos cristais tartáricos, ao criar uma barreira em torno dos núcleos de cristalização, e porque impede a aproximação de moléculas insolúveis de tartaratos (Sanz, 2012). Tem a desvantagem da sua eficiência na

estabilização do tartarato de cálcio ser inferior que na do bitartarato de potássio (Cabrita *et al.*, 2016).

A sua aplicação deve ser no momento antes do engarrafamento e a dose deve ser igual ou inferior a 100 mg/L (OIV, 2019). Recomenda-se ainda que a sua aplicação seja antes da clarificação final já que se pode verificar uma pequena turvação após o tratamento, especialmente se a taxa de esterificação do ácido metatartárico for elevada (Cabrita *et al.*, 2016). O efeito protetor do ácido metatartárico tem uma duração dependente da temperatura de armazenamento dos vinhos, uma vez que este ácido se hidrolisa rapidamente a temperaturas altas e lentamente a temperaturas baixas (OIV, 2019).

Por esse motivo, outra das suas desvantagens está relacionada com o facto de ser pouco estável no vinho, já que se hidrolisa ao longo do tempo gerando ácido tartárico, o que faz com que perca o seu efeito protetor e com que o risco de instabilidade tartárica aumente. A sua taxa de hidrólise depende do pH do vinho e da sua temperatura, podendo acontecer numa semana a 30°C ou passado 2 anos a 0°C. O tempo mais comum até que ela aconteça nas condições de uma adega, normalmente com temperaturas entre 10 e 18°C, é de 1 ano a 18 meses. Assim o ácido metatartárico só é adequado a vinhos armazenados a temperaturas controladas e que sejam para consumir num curto período de tempo (Lasanta e Gómez, 2012). Quanto mais elevada for a temperatura e mais baixo o pH maior é a perda de eficácia deste produto (Sanz, 2012).

Apesar das desvantagens, Gerbaud *et al.* (2010) considera o ácido metatartárico, antes da sua hidrólise ocorrer, o único aditivo capaz de uma total inibição do processo de nucleação e de crescimento dos cristais tartáricos, sendo que as carboximetilceluloses e as manoproteínas apenas conseguem atrasar o crescimento e o aparecimento destes cristais.

8.2.4. Poliaspartato de potássio, o novo aditivo autorizado

O poliaspartato de potássio ($[\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3\text{K}]_n$), atua como colóide protetor e é eficaz na estabilização tartárica dos vinhos, sendo produzido exclusivamente a partir do ácido L-aspártico (OIV, 2019). O processo de produção do poliaspartato de potássio inicia-se a partir de um processo térmico, em que o

ácido L-aspártico se transforma em polisuccinimida, insolúvel, que é posteriormente tratada com hidróxido de potássio em condições controladas, o que permite a abertura do seu anel e a sua polimerização, obtendo-se desta forma o poliaspartato de potássio (Triulzi *et al.*, 2015).

Em condições que favoreçam a sua despolimerização, o poliaspartato de potássio pode hidrolisar e originar de novo ácido L-aspártico (OIV, 2019) (figura 7).

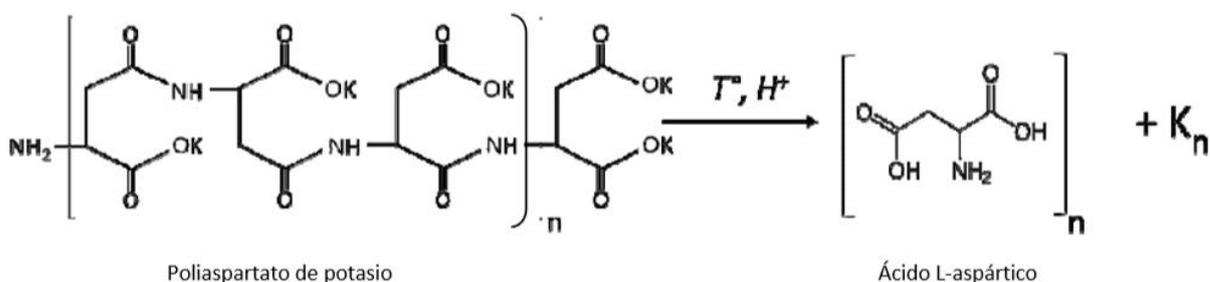


Figura 7. Hidrólise do poliaspartato de potássio em ácido L-aspártico (OIV, 2019).

O poliaspartato de potássio tem um peso molecular médio que varia de 3 a 10 kDalton e apresenta uma carga negativa. Antes de ser utilizado em enologia, o poliaspartato também era utilizado como agente desincrustante, devido à sua capacidade para modificar a estrutura cristalina dos sais de cálcio, bem como um aditivo em detergentes e como adjuvante na prevenção de placa dentária (Bosso, 2015).

Pensa-se que o modo de ação do poliaspartato seja semelhante ao do ácido metatartárico e ao da carboximetilcelulose, tendo estes uma carga negativa que interage com os iões de potássio existentes no vinho (Bosso, 2015). Isto porque o poliaspartato de potássio é também carregado negativamente ao pH do vinho, afetando a precipitação de cristais de bitartarato de potássio e o crescimento destes (Bosso *et al.*, 2015).

O poliaspartato de potássio utilizado em enologia apresenta-se na forma de um pó castanho claro, inodoro, muito solúvel em água, que se conserva

durante 4 anos à temperatura ambiente. Para que a sua solubilidade seja ótima, o seu grau de substituição deve ser no mínimo de 91,5% (OIV, 2019).

8.2.4.1. Como surgiu em enologia

O poliaspartato de potássio é o mais recente aditivo autorizado em enologia para utilização na estabilidade tartárica dos vinhos. O interesse nesta substância, ainda nunca antes utilizada neste ramo nem na indústria alimentar, surgiu num projeto de investigação europeu designado por STABIWINE, que teve início em 2012 e que ainda se encontra em curso, e que no qual estão envolvidos vários organismos especializados em enologia, polímeros, impacto ambiental e toxicologia, nomeadamente uma associação de produtores, empresas fabricantes e centros de pesquisa (Triulzi *et al.*, 2015).

As entidades envolvidas no projeto são associações de pequenas e médias empresas (Associação Italiana de Agricultura Biológica, Associação Interprofissional de Denominação de Origem Controlada de vinhos do Valle del Rodano e o Consórcio da Denominação de Origem de Carinena), institutos de investigação e universidades europeias (Conselho de Pesquisa em Agricultura e Análise da Economia Agrícola, o Instituto Francês da Vinha e do Vinho, Universidade de Turim, Milão e Zaragoza), bem como, outras entidades privadas, incluindo a Esseco, empresa que atua no setor químico do enxofre e dos seus derivados, e a Vinidea, empresa de investigação e formação no setor vitivinícola (Bosso, 2015).

O objetivo do STABIWINE é a identificação e o estudo de novas moléculas para a estabilização tartárica e proteica dos vinhos, sendo que em relação à estabilidade tartárica o estudo incidiu sobre a eficácia de algumas preparações à base de poliaspartatos (Bosso, 2015).

O estudo aprofundado do poliaspartato de potássio começou em 2013 e 2014, para que se compreendesse as suas características químicas e toxicológicas, bem como, a sua performance em enologia, mais propriamente na estabilização tartárica. Os resultados foram positivos e demonstraram o potencial da utilização desta substância para o fim referido. Foi também elaborado um dossier toxicológico pela EFSA (European Food Safety Authority),

no ano de 2014, com o objetivo de inserir o poliaspartato de potássio na lista dos aditivos permitidos para uso alimentar, sendo que os testes toxicológicos exigidos pela autoridade europeia demonstraram a ausência de qualquer efeito tóxico em caso de administração repetida da substância, e comprovaram a sua total salubridade (Triulzi *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos ao longo das experiências realizadas foram comunicados ao OIV, e em 2014 esta entidade apresentou uma proposta de resolução para autorização de uso do poliaspartato de potássio como um aditivo de estabilização tartárica dos vinhos. Depois disso, países europeus incluindo Itália, iniciaram testes experimentais deste produto à escala de uma adega (Bosso, 2015).

Ainda em 2014, a Enartis teve a autorização do Ministério da Política Agrícola, Alimentar e Florestal (MIPAAF) italiano, para realizar uma prova experimental do poliaspartato de potássio em grandes volumes (Triulzi *et al.*, 2015).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, em março de 2016, emitiu um parecer onde concluiu que, depois de avaliar a segurança do poliaspartato de potássio como aditivo alimentar, não existe nenhum problema de segurança na sua utilização no vinho, com um nível máximo 300 mg/L e a níveis típicos de 100-200 mg/L, dependendo do nível de instabilidade do vinho a tratar. Neste documento emitido, o poliaspartato de potássio é proposto como um estabilizante para ser utilizado na estabilização tartárica, contra a precipitação dos cristais de tartaratos, em vinhos tintos, rosés e brancos (European Food Safety, 2016).

Também em 2016, a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) adotou uma resolução no mês de outubro, de uma nova prática enológica relacionada com o tratamento dos vinhos com poliaspartato de potássio, decidindo introduzir na parte II do Código Internacional de Práticas Enológicas, a prática da adição de poliaspartato de potássio aos vinhos com o objetivo de contribuir para a sua estabilidade tartárica. Na mesma resolução é também referida uma dose máxima de aplicação de poliaspartato de potássio de 10 g/hL, mesmo nos vinhos com um nível elevado de instabilidade tartárica, informando

que doses superiores podem levar a um aumento da turbidez do vinho. Em vinhos tintos com grande instabilidade coloidal, é sugerido um tratamento prévio com bentonite (OIV, 2016).

Em julho de 2017, o Regulamento (UE) n.º 1399/2017 alterou o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo do Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão, para que o poliaspartato de potássio fosse incluído na lista da União de aditivos alimentares, atribuindo-lhe a designação de E 456, de forma a que fosse permitida a sua autorização como estabilizante no vinho, considerando o seu efeito estabilizante contra a precipitação de cristais tartáricos no vinho, sem impacto sobre as propriedades organoléticas deste (Regulamento UE 2017/1399).

Pouco tempo depois, em agosto do mesmo ano, o Regulamento Delegado (UE) n.º 2017/1961 da Comissão, autoriza o tratamento de vinhos com poliaspartato de potássio na União Europeia, com o objetivo da contribuição deste produto na estabilidade tartárica dos vinhos. Visto esta prática já ter sido autorizada pela OIV, este regulamento surge de forma a oferecer aos produtores da União as mesmas oportunidades que as de que dispõem os produtores de países terceiros, nas condições de utilização definidas pela OIV anteriormente referidas (Regulamento Delegado UE 2017/1961 da Comissão).

8.2.4.2. Estudos realizados até ser autorizado

Após ter sido descoberto o efeito inibitório do poliaspartato de potássio na precipitação do bitartarato de potássio, foram muitas as experiências realizadas com este produto para avaliar o seu potencial para ser utilizado como um aditivo enológico. Para isso estudou-se o seu efeito estabilizador em vinhos com diferentes composições físico-químicas, bem como as suas possíveis interações com a matéria corante, a estabilidade dos vinhos com ele tratados ao longo do tempo e quando submetidos a temperaturas elevadas, entre outros aspetos (Bosso, 2015).

No âmbito do projeto STABIWINE, estudou-se a eficácia de poliaspartatos em vinhos brancos e vinhos tintos, com diferente teor alcoólico, pH, teor em polifenóis e diferentes níveis de instabilidade tartárica, sendo que em todos os

casos, o poliaspartato permitiu obter vinhos estáveis (Bosso, 2015). Neste projeto foram realizadas experiências com a utilização do poliaspartato de potássio para estabilizar os vinhos tartaricamente, comparando-se a eficácia estabilizadora deste produto, com aquela que se obteve em vinhos tratados com ácido metatartárico, carboximetilcelulose e manoproteínas, na mesma dose. Verificou-se então que o poliaspartato de potássio tem uma eficiência estabilizadora elevada e semelhante à do ácido metatartárico, porém no caso da carboximetilcelulose as diferenças observadas foram um pouco superiores, sendo que esta se demonstrou menos eficiente (Triulzi *et al.*, 2015).

Ainda no decurso deste projeto, foram efetuados testes no Centro de Investigação de Enologia de Asti, em diferentes tipos de vinhos brancos e tintos, verificando-se que os poliaspartatos em doses iguais ao ácido metatartárico (100 mg/L), possuíam uma capacidade estabilizadora contra precipitação tartárica igual à deste (Bosso, 2015)

Bosso *et al.* (2015), numa experiência realizada em vinhos brancos e tintos tratados com diferentes poliaspartatos, incluindo um poliaspartato de potássio, e com ácido metatartárico, todos numa dose de 100 mg/L, para verificar o efeito destes aditivos na estabilidade tartárica, também concluiu que não houve diferenças significativas na eficiência demonstrada pelo ácido metatartárico e os poliaspartatos, o que demonstra o bom efeito estabilizante do poliaspartato de potássio.

Em relação à estabilidade ao longo do tempo em vinhos tratados com este composto, no decurso de experiências realizadas no projeto STABIWINE, com vinhos brancos e tintos engarrafados, alguns foram tratados com poliaspartato de potássio e outros ácido metatartárico, verificando-se que o poliaspartato tem uma estabilidade ao longo do tempo muito superior à do ácido metatartárico, sendo que este último, em alguns casos perdeu a sua eficácia depois de 3 meses de armazenamento em garrafa. Já o poliaspartato de potássio, manteve o vinho estável até ao fim desta experiência com a duração de um ano. O poder estabilizante do poliaspartato de potássio, mantido ao longo do tempo, confirmou-se pelo baixo aumento no teor de ácido aspártico que se libertou por hidrólise para o vinho. Depois de um ano de conservação do vinho em garrafa, só se verificou um aumento de cerca de 5 mg/L, no teor deste aminoácido, o que

corresponde à hidrólise de cerca de 5% do poliaspartato adicionado (Bosso, 2015).

Numa outra experiência, determinou-se a estabilidade tartárica de vinhos brancos e tintos, tratados com poliaspartato de potássio e com ácido metatartárico, no momento da sua adição, após 5 meses e após 12 meses. O que se verificou foi que após 5 meses alguns vinhos com ácido metatartárico começaram a ficar instáveis, e ao fim de 12 meses este produto já tinha perdido completamente a sua eficácia. O mesmo não aconteceu nos vinhos tratados com poliaspartato de potássio, já que este manteve o seu efeito até ao fim do período da experiência, havendo um aumento de ácido aspártico no vinho ao fim de 12 meses que correspondeu à hidrólise de apenas 4,9% do poliaspartato adicionado aos vinhos brancos, e 8,2% nos vinhos tintos (Bosso *et al.*, 2015).

Triulzi *et al.* (2015), também estudaram a duração do efeito estabilizante do poliaspartato de potássio, submetendo vinhos tratados com este produto e vinhos tratados com ácido metatartárico, à dose de 10 g/hL, a 40°C durante 14 dias, verificando no final deste período um aumento elevado da instabilidade tartárica dos vinhos com ácido metatartárico, e nos vinhos tratados com poliaspartato de potássio a estabilidade tartárica manteve-se igual à que tinham inicialmente, demonstrando a capacidade deste produto em manter o vinho estável, inclusive quando sujeito a temperaturas mais elevadas.

Relativamente à interação do poliaspartato de potássio com a matéria corante do vinho, Bosso *et al.* (2015) verificou através da medição do teor em antocianinas e em flavonoides de vinhos tintos, antes e após a adição de poliaspartato de potássio, que não houve alteração da sua cor. O mesmo verificou Triulzi *et al.* (2015) que ao adicionar poliaspartato de potássio ao vinho tinto, concluiu passado 21 dias que não houve qualquer efeito destabilizante na cor.

Numa experiência com a duração de 12 meses, na qual vinhos tintos com diferentes teores de antocianinas e polifenóis totais foram tratados com ácido metatartárico e poliaspartato de potássio, na mesma dose, e foram engarrafados, medindo-se no início e no fim da experiência parâmetros de cor (intensidade da cor e tonalidade), o teor de flavonoides e de antocianinas totais

em todos os vinhos. O que se verificou foi que houve uma diminuição normal na intensidade da cor e no teor em antocianinas, enquanto que o teor em flavonoides permaneceu estável, não tendo sido nenhum destes parâmetros afetado pelos aditivos (Bosso, 2015).

Foi ainda estudado o impacto do poliaspartato de potássio na filtrabilidade do vinho, não havendo qualquer alteração pela adição do referido produto, tal como, o seu impacto sensorial no vinho, que se demonstrou ser nulo uma vez que o poliaspartato não modificou as suas características organoléticas. De facto, o poliaspartato de potássio, nos estudos realizados mostrou ser um produto com elevada eficácia na estabilização tartárica, com um efeito superior à carboximetilcelulose e às manoproteínas e, semelhante ao ácido metatartárico, tendo a vantagem de possuir um efeito duradouro no tempo (Triulzi *et al.*, 2015).

8.3. Resinas de troca catiónica

As resinas de troca iónica, através de permutadores catiónicos, foram autorizadas pela União Europeia em 2009, para a prevenção da precipitação dos sais tartáricos nos vinhos (Simões *et al.*, 2013). Estas resinas de troca catiónica, substituem os iões de K^+ do vinho por iões de H^+ vindos dela (Lasanta e Gómez, 2012). Durante esta operação o vinho passa por uma coluna de resina polimerizada permitindo a troca de catiões entre eles (OIV, 2019a).

Para além dos iões de potássio, também outros catiões são removidos do vinho, ainda que em menor quantidade, como é o caso do cobre, ferro, magnésio e cálcio, o que poderá ser também um aspeto vantajoso na prevenção da oxidação dos vinhos, bem como, da casse férrica, apesar do objetivo principal desta técnica ser a estabilização tartárica (Cabrita *et al.*, 2016).

As resinas comerciais que existem no mercado para equipamentos de troca iónica são compostas por uma estrutura polimérica de estireno-divinilbenzeno com grupos funcionais de ácido sulfónico (Cabrita *et al.*, 2016). Estas devem ser totalmente insolúveis no vinho e ausentes de compostos que alterem as características organoléticas deste (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Segundo a OIV (2019a), as resinas catiónicas permitem a obtenção de um vinho

estável do ponto de vista tartárico, não só em relação ao bitartarato de potássio, mas também ao tartarato de cálcio.

As resinas de troca catiónica de hidrogénio podem provocar uma grande diminuição no pH nos vinhos, pela substituição da maioria dos seus catiões, nomeadamente o potássio, por iões de hidrogénio, levando a uma acidificação dos vinho, que pode ser vantajosa naqueles que têm pouca acidez, como é o caso dos que são de locais de clima mais quente, porém noutras situações isso pode não ser desejado. Esta descida brusca do pH consegue-se prevenir pela realização do tratamento a apenas a uma fração do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Por este motivo a OVI (2019a), afirma que apenas uma percentagem mínima de vinho, deve ser sujeita a esta operação. Cabrita *et al.* (2016) reforçam a ideia referindo que apenas 10 a 20% do volume do vinho deve ser tratado com as resinas e só depois deve ser misturado com o restante.

Trata-se de uma técnica eficiente em todos os vinhos e pouco dispendiosa em termos de tempo e energia (Lasanta e Gómez, 2012). Apesar disso ainda não está totalmente claro o seu impacto nas características organoléticas dos vinhos (Cabrita *et al.*, 2016).

8.4. Eletrodialise

A eletrodialise é uma técnica que permite alcançar a estabilidade tartárica nos vinhos, em que através de membranas seletivas e de um campo elétrico, se consegue eliminar iões do vinho, nomeadamente iões de potássio, impedindo a precipitação do bitartarato de potássio (Corti e Paladino, 2016). Esta técnica utiliza membranas de permeabilidade seletiva aos iões do vinho, que são de dois tipos: catiónicas que são permeáveis apenas a catiões, como o K^+ , o Na^+ e o Ca^{2+} ; e aniónicas que são permeáveis apenas a aniões, nomeadamente ao HT^- (Santos *et al.*, 2000).

Um equipamento de eletrodialise é composto por estas membranas dispostas alternadamente, com uma distância entre elas de 300 a 700 μm , criando compartimentos no espaço que as separa. Nesses compartimentos, circula vinho de um lado da membrana, e do outro circula um eletrólito que recebe os iões do vinho, havendo um circuito em paralelo destas duas soluções.

Para que se crie uma diferença de potencial, de maneira a que os aniões e catiões migrem do vinho para o eletrólito, existem dois elétrodos, um em cada ponta do sistema (Lasanta e Gómez, 2012), sendo que o sistema é submetido a uma diferença de potencial na ordem de 1 V/cm (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Em eletrodialise, um dos elétrodos é um cátodo, atraindo os aniões do vinho, e o outro é um ânodo, atraindo os catiões, incluindo o cálcio e o potássio. Os iões começam assim a migrar em direção aos elétrodos, sendo que as membranas catiónicas apenas permitem passar os catiões do vinho, e as membranas aniónicas apenas permitem passar aniões. Isto faz com que os catiões do vinho após passarem a membrana catiónica sejam parados pela membrana seguinte, que é aniónica, ficando no compartimento entre elas as duas. O mesmo para os aniões que ao passarem a membrana aniónica, são bloqueados pela membrana seguinte que é catiónica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) (figura 8).

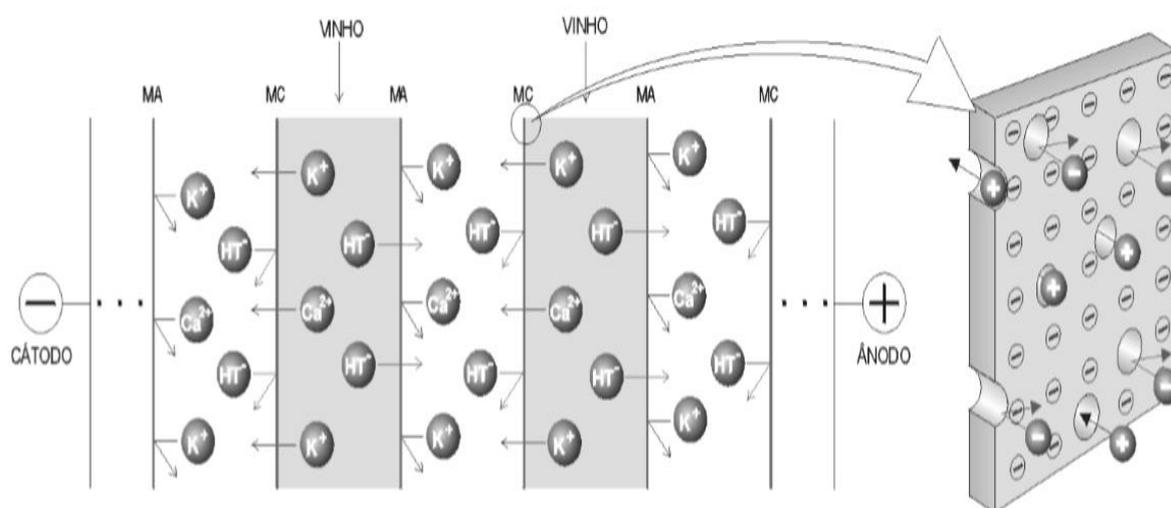


Figura 8. Esquema do modo de funcionamento da eletrodialise e à direita uma membrana catiónica em pormenor (MC – membrana catiónica; MA – membrana aniónica) (Santos *et al.*, 2000).

Em relação aos catiões do vinho, o potássio é o que migra de uma forma mais intensa, sendo que os restantes migram a uma velocidade inferior (Corti e Paladino, 2016).

O vinho circula no equipamento de eletrodialise até se obter a redução de iões desejada pelo tratamento (Lasanta e Gómez, 2012), sendo que no final este e a solução concentrada (solução salina), são recolhidos em separado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Em eletrodialise, como a superfície de contacto com o vinho é menor que nas resinas de troca iónica, consegue-se prevenir a adsorção de compostos orgânicos, preservando as características organoléticas do vinho.

Uma das desvantagens desta técnica é a compra do seu equipamento implicar um elevado investimento inicial, e para além disso, as membranas têm uma vida útil de curta duração e um custo elevado. Também o aluguer deste tipo de equipamento é caro, o que não atrai muitos produtores (Corti e Paladino, 2016).

9. Materiais e Métodos

9.1. Vinhos utilizados no estudo

Para o ensaio foram utilizados 4 vinhos brancos alentejanos (V1, V2, V3, V4) de 2018. Realizaram-se análises físico-químicas a todos eles, nas quais se determinou o SO₂ livre, o SO₂ total, o teor alcoólico, a acidez total, a acidez volátil e o pH (OIV, 2014) Foi ainda determinada a estabilidade tartárica, através do teste do mini contacto, e a estabilidade proteica pelo teste a quente, em todos os vinhos.

9.2. Delineamento do ensaio

9.2.1. Estabilização tartárica dos vinhos através de diferentes tratamentos

Vários tratamentos para prevenir a instabilidade tartárica foram testados nos 4 vinhos, nomeadamente, a estabilização pelo frio e a adição de aditivos comerciais, nomeadamente 2 tipos de poliaspartatos de potássio líquidos da Enartis, o Zenith Uno e o Zenith Color; 1 ácido metatartárico sólido da Proenol, o Metacremor 40+; e 1 manoproteína líquida, a Claristar.

Para facilitar a escrita utilizaram-se siglas que simbolizam cada tratamento: F para o frio; PASP1 para o Zenith Uno; PASP2 para o Zenith Color; AMT para o ácido metatartárico; e MAN para a manoproteína.

Os dois poliaspartatos foram testados em doses de 50 e 100 mL/hL e o ácido metatartárico numa dose de 100 mg/L. O tratamento com as manoproteínas apenas foi realizado nos 2 vinhos que apresentaram uma menor instabilidade proteica (V3 e V4), uma vez que o produto utilizado é aconselhado aplicar só depois dos vinhos estarem estáveis a esse nível. Utilizou-se duas doses diferentes de manoproteína, uma de 50 mL/hL e outra de 100 mL/hL.

Preparou-se uma amostra de cada vinho para cada tipo de tratamento, à exceção da adição da manoproteína que foi feita apenas em dois vinhos (V3 e V4) como já foi referido. Na preparação das amostras utilizou-se 250 mL de vinho, sendo colocado em garrafas de vidro com essa capacidade. O ensaio foi

feito em duplicado, o que fez no total 56 amostras. As amostras de vinho que foram submetidas ao tratamento pelo frio foram colocadas no frigorífico a uma temperatura de 4,5°C, tendo permanecido aí 15 dias e, as restantes que foram tratadas com os aditivos, armazenaram-se a 18°C durante 8 dias. Todas as garrafas foram fechadas com uma tampa de forma a evitar oxidações. Para se avaliar o efeito dos tratamentos, determinou-se a estabilidade tartárica de todas as amostras através do teste do minicontacto após o respetivo período de tempo, utilizando-se nesse teste 100 mL de cada uma.

Para uma melhor compreensão do ensaio efetuado, encontram-se ilustrados na tabela 3 os tratamentos efetuados em cada amostra vinho.

Tabela 3. Tratamentos de estabilização tartárica efetuados nos vinhos utilizados no ensaio.

Vinhos	Frio	Ácido metatartárico	Manoproteína		PASP1		PASP2	
		100 mg/L	50 mL/hL	100 mL/hL	50 mL/hL	100 mL/hL	50 mL/hL	100 mL/hL
V1	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
V2	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
V3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
V4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

A figura 9 é uma fotografia do ensaio realizado, composto por 56 amostras. Cada garrafa foi etiquetada e identificada com nome do vinho que continha e o respetivo tratamento a que foi sujeito.



Figura 9. Ensaio realizado em garrafas de 250 mL, etiquetadas com o nome do tratamento a que as amostras de vinho foram submetidas.

9.2.2. Efeito do poliaspartato de potássio na estabilidade tartárica dos vinhos ao longo do tempo

No final da primeira experiência, ainda com os 150 mL que sobraram das amostras, realizou-se uma segunda experiência para avaliar a eficácia dos poliaspartatos de potássio ao longo do tempo, e compará-la com a que se obtém através da estabilização através do ácido metatartárico e das manoproteínas. Para isso, recorreu-se ao envelhecimento acelerado das amostras de vinhos sujeitas anteriormente aos tratamentos com esses aditivos, durante 2 meses numa estufa a 30°C. As amostras de vinhos foram colocadas em garrafas de 150 mL e todas elas foram tapadas, perfazendo no total 48 amostras, como se pode observar na figura 10. No final desse período realizou-se novamente o teste do mini contacto para a determinação da estabilidade tartárica de cada uma das amostras.



Figura 10. Ensaio das 48 amostras de vinhos em garrafas de 150 mL que foram colocadas na estufa.

Como os estudos efetuados nesta dissertação ocorreram em 3 períodos de tempo diferentes (antes das amostras de vinhos serem submetidas aos tratamentos; após as amostras de vinhos serem sujeitas aos tratamentos; e depois das amostras de vinhos tratadas terem estado dentro da estufa em envelhecimento acelerado), criaram-se as designações de Tempo 0, Tempo 1 e Tempo 2 para cada um destes períodos de forma a simplificar a escrita, sendo:

- Tempo 0 - aquele que existiu com os vinhos ainda sem qualquer tipo de tratamento, quando se determinou pela primeira vez a sua estabilidade tartárica;
- Tempo 1 - o que ocorreu depois da realização dos diferentes tratamentos nas amostras de vinho e após o período de espera até que fizessem efeito (8 dias nos vinhos com aditivos e 15 dias nos vinhos que foram para o frigorífico). Altura em que pela segunda vez se realizou o teste do mini contacto;
- Tempo 2 - após a saída das amostras da estufa, quando se realiza pela terceira vez o teste do mini contacto.

9.2.3. Determinação do teor de ácido aspártico nos vinhos

Por cromatografia de fase líquida, mediu-se o teor em ácido aspártico, um aminoácido que nos vinhos se encontra naturalmente presente, de todos vinhos (V1, V2, V3 e V4) antes de serem sujeitos aos tratamentos de estabilização tartárica (tempo 0) e, posteriormente, nas amostras do ensaio que foram tratadas com o poliaspartato de potássio PASP1, na dose de 100 mL/hL, após o envelhecimento acelerado na estufa (tempo 2).

9.3. Métodos Analíticos

De seguida serão descritos todos os métodos analíticos utilizados neste estudo.

9.3.1. Estabilidade proteica a quente

Determinou-se a estabilidade proteica dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo, através do Teste da Estabilidade Proteica a Quente. Neste teste, começa-se pela filtração de 100 mL de cada vinho através de uma membrana de 0,45 µm, utilizando-se um sistema de filtração por vácuo. O vinho filtrado é então distribuído por 3 tubos de ensaio, em que um serve de testemunha e os outros 2 são submetidos ao teste a quente. Nesse teste, os 2 tubos de ensaio de cada vinho são colocados em banho-maria a 80°C durante 30 minutos. No final desse tempo, retiram-se os tubos do banho-maria e são colocados num suporte, onde ficam em repouso durante 24 horas.

Após as 24 horas, faz-se a leitura das amostras, incluindo a testemunha, num turbidímetro (figura 11), onde se lê as Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU). Considera-se o valor da turbidez do vinho o resultado da subtração da turbidez média das duas amostra aquecidas com a turbidez da testemunha.



Figura 11. Turbidímetro utilizado para medir a turbidez das amostras de vinho.

Na interpretação do teste, considera-se um vinho instável quando existir um aumento superior a 2 unidades entre o valor da amostra testemunha e a amostra aquecida. Apesar disso este critério pode variar consoante o risco de turvação do vinho no seu armazenamento que se queira correr, podendo ser de 1 ou 1,5 unidades.

Em relação aos vinhos brancos, de acordo com a literatura, consideram-se brilhantes se a sua turbidez for inferior a 1,0 NTU, e consideram-se turvos se esta for superior a 4,4 NTU. Na tabela 4 encontram-se os valores tidos como referência.

Tabela 4. Estado da turvação dos vinhos em função da sua turbidez (NTU).

Estado da turvação	Turbidez (NTU)		
	Vinho Branco	Vinho Rosado	Vinho Tinto
Brilhante	< 1,0	< 1,2	< 2,0
Turvo	> 4,4	> 4,8	> 8,0

9.3.2. Teste do mini contacto

O aparelho utilizado no teste do mini contacto foi o Check Stab α 2008 Life (figura 12), no qual se introduz um copo com 100 cm³ da amostra de vinho a analisar. Este aparelho tem uma bandeja num dispensador automático onde se coloca o bitartarato de potássio, sendo que em vinhos brancos e rosados se utiliza 1 grama deste e em vinhos tintos 2 gramas. Durante a análise, a amostra é arrefecida até aos 0°C. Quando atinge essa temperatura, o aparelho adiciona o THK ao copo com a amostra, sendo feitas a partir daí 240 leituras da temperatura e da condutividade do vinho, durante 4 minutos, o que corresponde a 1 leitura por segundo. No final da análise o aparelho indica, através de um computador a ele ligado, a condutividade elétrica inicial e final, bem como, o valor da variação condutividade, mostrando ainda um gráfico da condutividade em função do longo do tempo.



Figura 12. Aparelho utilizado no teste do mini contacto.

Na interpretação dos resultados do teste do mini contacto tem-se em conta a informação existente na tabela 5:

Tabela 5. Estabilidade do vinho em função da sua variação da condutividade elétrica (μS).

Estabilidade do vinho	Variação da Condutividade Elétrica (μS)	
	Vinhos Brancos	Vinhos Tintos e Rosados
Muito estável	< 25	< 30
Estável	25-40	30-60
Em risco	40-60	60-70
Não estável	> 60	> 70

O aparelho Check Stab α 2008 Life, permitiu também a medição da temperatura de saturação, arrefecendo a amostra de vinho até aos zero graus, altura em que adiciona o bitartarato de potássio. Depois disso a amostra arrefecida é submetida a aumentos de temperatura de $0,5^{\circ}\text{C}$, até atingir os 24°C , durante os quais a condutividade elétrica vai sendo registada.

9.3.3. Envelhecimento acelerado

As amostras de vinhos com os diferentes tipos de tratamentos foram colocadas no interior de uma estufa a 30°C durante 2 meses, de forma a acelerar o processo de envelhecimento. Este binómio tempo temperatura foi escolhido em função de várias referencias na literatura (embora com finalidades diferentes) e em função do tempo disponível para a realização do ensaio.

9.3.4. HPLC (High performance liquid chromatography)

O teor em ácido aspártico dos vinhos foi determinado por HPLC, isto é, por cromatografia líquida de alta eficiência. Trata-se da técnica mais utilizada para a

determinação de aminoácidos e de aminas biogénicas nos alimentos, incluindo no vinho (Wang *et al.*, 2014).

A cromatografia em fase líquida é um processo que permite a separação dos compostos da amostra a analisar, nomeadamente dos aminoácidos e das aminas biogénicas, pela sua migração numa coluna de cromatografia através de uma fase móvel líquida. A fase estacionária encontra-se dentro dessa coluna, consistindo em pequenas partículas sólidas (Araújo, 2004).

Os compostos da amostra de interesse são separados na coluna através de mecanismos de interação com a fase móvel e com a fase estacionária, sendo eluídos da coluna consoante a sua afinidade com a fase estacionária (Costa, 2015)

Na figura 13 é possível observar um esquema representativo de sistema de HPLC.

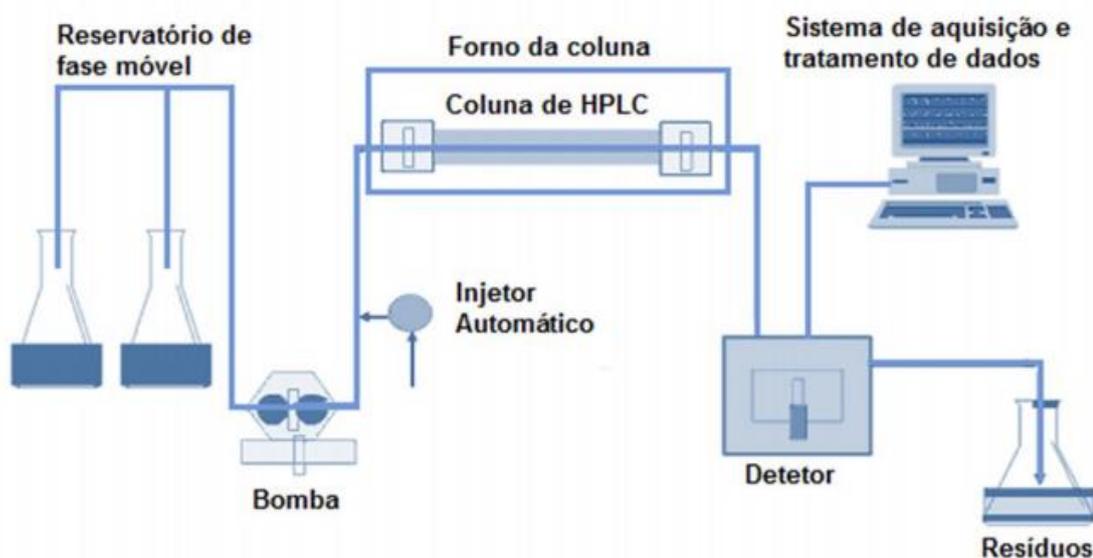


Figura 13. Modo de funcionamento de um sistema HPLC (Costa, 2015).

Neste sistema a fase móvel encontra-se em dois reservatórios, havendo uma bomba de alta pressão que a bombeia para a coluna a pressões elevadas, de maneira a que a consiga atravessar. A amostra a analisar é introduzida na fase

móvel através de um injetor, acompanhando o seu trajeto até à coluna (Araújo, 2004).

À saída da coluna existe um detetor que deteta a absorvância dos componentes que vão sendo daí eluídos, emitindo um sinal elétrico a um sistema de aquisição e tratamento de dados, nomeadamente a um software de computador, com a informação do valor de absorvância detetado. Esse software por sua vez, cria um gráfico, designado por cromatograma (figura 14), da absorvância em função do tempo de retenção, isto é, do tempo de cada composto que vai desde a sua injeção até à sua deteção pelo sistema (Costa, 2015).

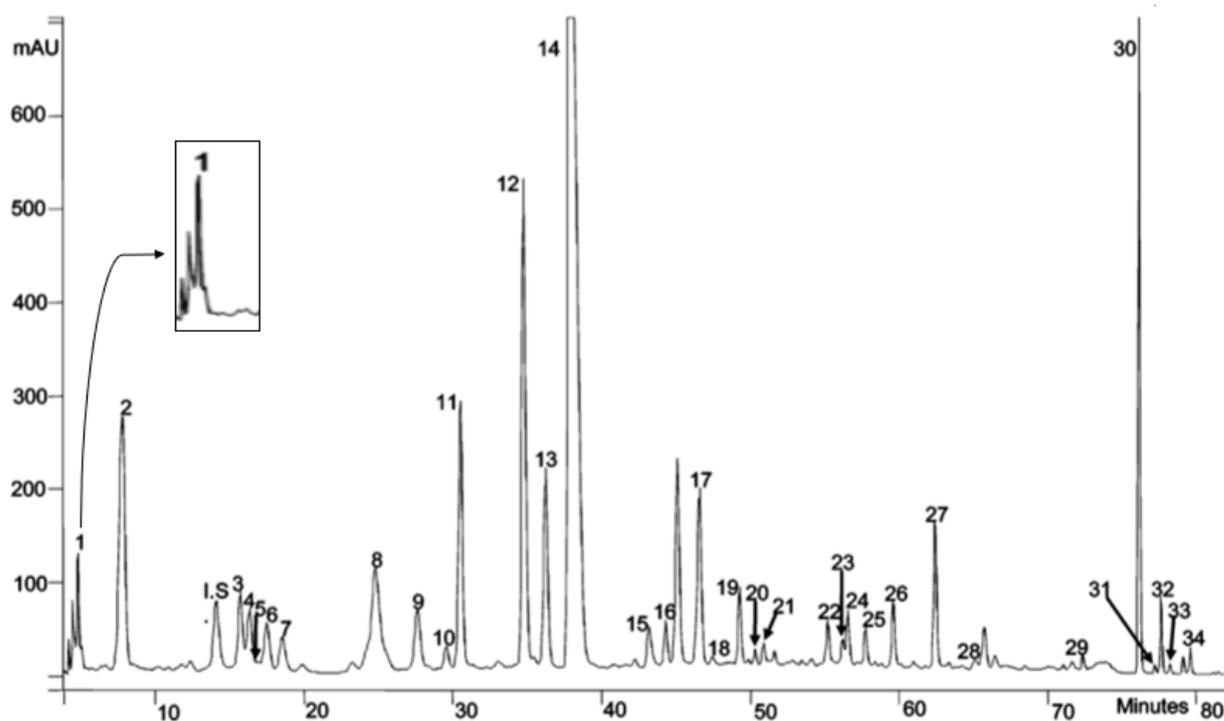


Figura 14. Cromatograma de um vinho tinto, obtido por HPLC, das derivativas de aminas biogénicas, aminoácidos e do ião amónio, a 280 nm. O ácido aspártico corresponde ao pico que está assinalado com o número 1 (Gómez-Alonso et al., 2007).

Pela análise do cromatograma consegue-se identificar os componentes separados, nomeadamente os aminoácidos, através dos tempos de retenção. A

quantificação de cada elemento é feita através da área do respetivo pico (Costa, 2015), convertida em concentração através de retas de calibração.

No caso do ácido aspártico, a reta de calibração é:

$$y = 0,0233x - 0,462 \quad (r^2 = 0,9961),$$

sendo x a concentração deste aminoácido e y o valor obtido pela divisão da área do pico do ácido aspártico pela área do pico do padrão interno.

Outro aspeto importante diz respeito ao facto de a análise de aminas biogénicas e de aminoácidos ser difícil devido não só às suas diferentes estruturas, mas também por estes compostos serem desprovidos de cromóforos específicos, isto é, das moléculas responsáveis pelas suas cores. Por este motivo, antes da análise por HPLC das amostras, é necessária a chamada derivatização pré-coluna. Esta consiste numa reação dos compostos a analisar, nomeadamente dos aminoácidos e das aminas biogénicas, com um agente de derivatização que os derivatiza, melhorando os seus limites de deteção (Gómez-Alonso *et al.*, 2007).

Um dos reagentes de derivatização mais utilizados é o dietil etoximetilenemalonato, também conhecido por DEEM, capaz de reagir com aminoácidos e aminas biogénicas, produzindo derivativas que se conseguem detetar por espectroscopia ultravioleta. Estas derivativas são estáveis durante vários dias à temperatura ambiente e ao serem capazes de ser detetas por um detetor UV, permitem em vinhos e em mostos a deteção destes compostos (Wang *et al.*, 2014).

No estudo realizado, o método utilizado para a análise de aminoácidos dos vinhos teve como agente derivatizante o dietil etoximetilenemalonato (DEEM). A mistura da derivatização foi feita em tubos de ensaio, colocando-se em cada um:

- 1,75 mL de tampão borato 1M (pH = 9);
- 750 µL de metanol HPLC;
- 1 ml de amostra de vinho;
- 20 µL de padrão interno L-2-Ácido aminoapídico 1g/L;
- 30 µL de DEEM (agente derivatizante - dietil etoximetilenemalonato).

Para cada vinho fez-se 3 réplicas da derivatização.

Os tubos de ensaio com a mistura foram colocados durante 30 minutos num banho de ultrassons e no final desse período, levaram-se para uma estufa a 70°C onde permaneceram durante 2 horas para que se garantisse a degradação do excesso do agente derivatizante e de outros bioprodutos.

Depois disso as amostras foram filtradas e colocadas em tubos de HPLC, sendo a etapa seguinte a análise cromatográfica. Para isso utilizou-se o aparelho de HPLC Waters e2685, com um detetor PDA. A separação cromatográfica realizou-se na coluna ACE 5 C18-HL (250 x 4,6 mm).

A composição das fases móveis foi: Fase A, 3 mL de NaOH 40%; 2,9 mL de ácido acético; 0,4 g de azida de sódio (pH 5,8). Fase B, 80% acetonitrilo e 20% etanol.

Os aminoácidos foram identificados de acordo com os respetivos tempos de retenção standardizados. A sua quantificação foi feita através retas de calibração em que se utilizou os valores das áreas dos respetivos picos.

10. Resultados e Discussão

O resultado das análises físico-químicas realizadas aos 4 vinhos brancos utilizados no estudo, encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Análise sumária dos vinhos V1, V2, V3 e V4.

Vinhos	Teor alcoólico adquirido (%v/v alc.)	Acidez Volátil Ácido Acético (g/L)	Acidez Total Ácido Tartárico (g/L)	pH	SO₂ Livre (mg/L)	SO₂ Total (mg/L)
V1	12,9	0,27	4,65	3,59	14	100
V2	13,1	0,30	4,74	3,56	11	118
V3	12,3	0,30	5,07	3,53	19	116
V4	13,1	0,30	5,31	3,52	20	113

Através dos resultados obtidos com as análises, verificou-se que os teores de acidez volátil, de acidez total e de sulfuroso livre, encontram-se dentro dos limites legais.

Em relação à acidez volátil, expressa em ácido acético (g/L), o máximo permitido por lei num vinho branco é 18 meq/L, a que corresponde a 1,08 g/L de ácido acético (Regulamento CE 606/2009 da Comissão). Todos os vinhos analisados têm valores de acidez volátil abaixo desse valor, estando por isso dentro dos conformes legais.

A acidez total dos vinhos analisados, expressa em ácido tartárico (g/L), encontra-se também dentro da lei uma vez que esta impõe um limite mínimo de 3,5 g/L de ácido tartárico, sendo que todos os vinhos têm uma acidez total que ultrapassa esse valor (Regulamento CE 491/2009 do Conselho).

Relativamente SO₂ Total, cujo limite máximo nos vinhos brancos é de 200 mg/L, verificou-se que todos os vinhos analisados cumprem a lei já que têm teores inferiores a este (Regulamento CE 606/2009 da Comissão).

10.1. Estabilidade proteica e tartárica dos vinhos

Em relação à estabilidade proteica dos vinhos utilizados, os valores de turbidez medidos estão na tabela 7.

Tabela 7. Valores de turbidez dos 4 vinhos brancos.

Vinhos	Turbidez (NTU)
V1	12,31
V2	17,42
V3	1,22
V4	2,90

Como se considera um vinho turvo se a sua turbidez for superior a 4,4 NTU e brilhante se for inferior a 1 NTU, pode-se verificar que nenhum dos vinhos é brilhante e que o V1 e o V2 estão turvos, sendo o V2 aquele que apresenta uma turbidez superior. O V3 é o vinho com menor turbidez, com valores próximos de 1.

Na tabela 8, pode observar-se os valores obtidos de turbidez das amostras de vinho aquecidas e das amostras de vinhos testemunhas. Pela observação dos valores, todos os vinhos estão instáveis proteicamente uma vez que houve um aumento de turbidez superior a 2 unidades entre o valor da amostra testemunha e a amostra aquecida.

Tabela 8. Valores de turbidez medidos da amostra aquecida e da amostra testemunha dos 4 vinhos brancos.

Vinhos	Turbidez (NTU)	
	Amostra aquecida	Amostra Testemunha
V1	13,8	1,49
V2	19,3	1,88
V3	4,05	2,83
V4	4,52	1,62

Do ponto de vista da estabilidade tartárica, os resultados obtidos pelo teste do mini contacto dos 4 vinhos brancos encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Valores da condutividade elétrica inicial, final e da sua variação, bem como da temperatura de saturação, determinados através do teste do mini contacto, dos 4 vinhos brancos.

Vinhos	Condutividade elétrica inicial (μS/cm)	Condutividade elétrica final (μS/cm)	Variação Condutividade elétrica (μS/cm)	T_{sat} (°C)
V1	1500	1417	83	22,8
V2	1490	1418	72	23,1
V3	1568	1460	108	22,1
V4	1587	1528	59	22,7

Pela observação dos valores da variação da condutividade elétrica, que nos vinhos V1, V2 e V3 foram superiores a 60, conclui-se que estes estão instáveis. O vinho V4 considera-se em risco, mas muito perto da instabilidade, uma vez que essa variação é de 59 μS/cm. Assim, verifica-se que nenhum dos vinhos brancos se encontra estável do ponto de vista tartárico uma vez que só se consideram estáveis quando a variação da condutividade elétrica se encontra entre 40 e 25 μS/cm, e muito estáveis quando a variação da condutividade elétrica é inferior a 25 μS/cm.

É possível observar graficamente as diferenças de estabilidade tartárica entre os 4 vinhos, através do gráfico de barras apresentado na figura 15, sendo fácil de constatar que o vinho V3 é o mais instável e que o vinho V4 é o que tem uma instabilidade menor. A ordem crescente de instabilidade tartárica dos vinhos em estudo é: V4 < V2 < V1 < V3.

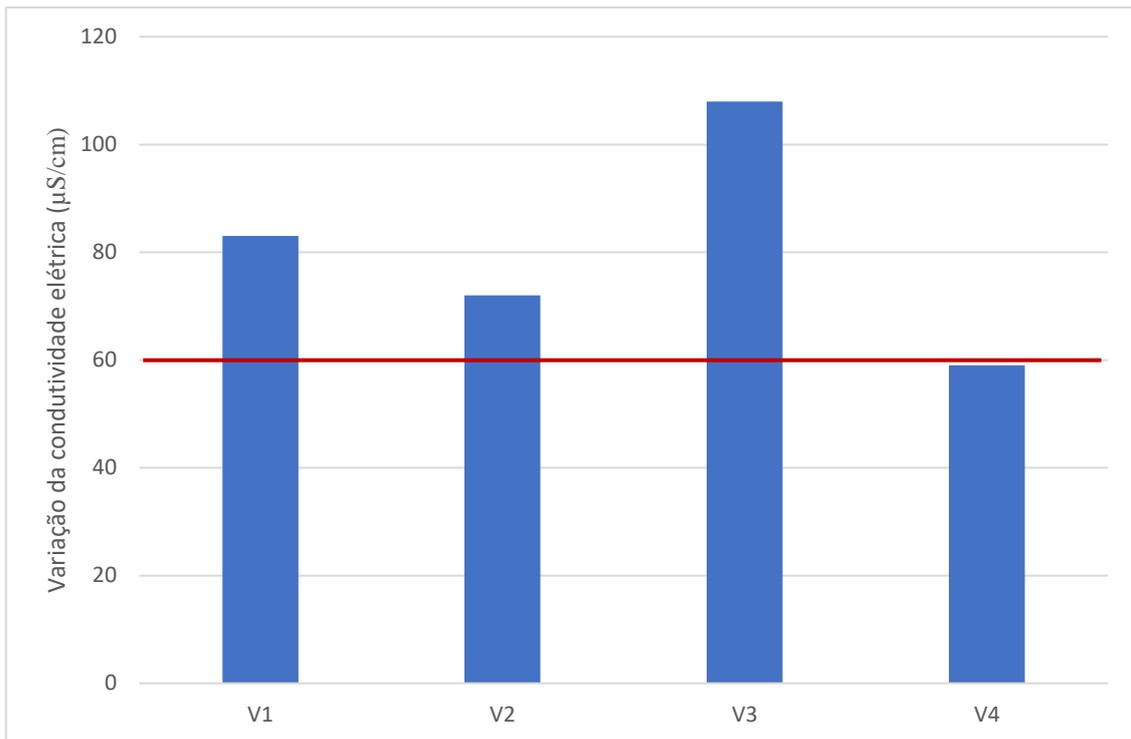


Figura 15. Estabilidade tartárica dos 4 vinhos brancos dada pelos resultados obtidos no teste do mini contacto ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Em relação à temperatura de saturação, os 4 vinhos apresentaram valores muito semelhantes, a rondar os 22 e os 23°C. Estas temperaturas estão acima da temperatura ambiente o que demonstra mais uma vez a instabilidade dos vinhos.

10.2. Efeito dos diferentes tratamentos na estabilidade tartárica dos vinhos

Os resultados obtidos através do teste do mini contacto, das amostras de vinhos submetidas aos diferentes tratamentos de estabilidade tartárica podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10. Valores da variação da condutividade elétrica, obtidos pelo teste do mini contacto, das amostras de vinho sujeitas aos diferentes tratamentos de estabilidade tartárica.

Vinhos	Variação da Condutividade Elétrica ($\mu\text{S/cm}$)								
	Tempo 0	Tempo 1							
		Frio	PASP1		PASP2		Ácido metatartárico	Manoproteína	
			Dose (mL/hL)		Dose (mL/hL)		Dose (mg/L)	Dose (mL/hL)	
	50	100	50	100	100	50	100		
V1	83	69,45	22,2	18,7	28,2	20,7	13,35		
V2	72	56,65	22,05	17,8	26,55	19,6	13,05		
V3	108	31,85	27,25	22,05	42,55	24,75	14,15	107,55	89,1
V4	59	27,25	21,3	18,55	26,35	19	13,85	59,35	49,7

De acordo com os resultados obtidos, consegue-se verificar que em todas as amostras de vinho, após os respetivos tratamentos de estabilização tartárica, houve uma diminuição da sua variação da condutividade elétrica, havendo amostras que ficaram estáveis e outras que permaneceram instáveis, o que demonstra que os tratamentos utilizados têm diferente eficácia.

O ácido metatartárico foi o que provocou o maior decréscimo na variação da condutividade elétrica das amostras de vinho, o que demonstra ser o tratamento com maior eficácia, deixando todos os vinhos muito estáveis (variação da condutividade elétrica < 25).

Em relação aos poliaspartatos de potássio utilizados, tanto o PASP1 como o PASP2 conseguiram deixar as amostras de vinho estáveis, quer na dose de 50 mL/hL quer na dose de 100 mL/hL, à exceção do vinho V3 que ficou em risco com o tratamento do PASP2 na dose de 50 mL/hL. Apesar disso, a estabilidade alcançada não foi tão boa como a que se obteve com o ácido metatartárico, já que este conseguiu uma diminuição superior da variação da condutividade elétrica.

A dose de 100 mL/hL mostrou ser a mais eficaz na estabilização dos vinhos em ambos os poliaspartatos, deixando todas as amostras de vinho muito estáveis. A dose de 50 mL/hL, no caso do PASP1 também deixou todos os vinhos muito estáveis, à exceção do vinho V3 que ficou apenas estável como já foi referido. Já o PASP2 nesta dose, não proporcionou resultados tão bons, deixando os vinhos V1, V2 e V3 estáveis e o vinho V3 em risco.

Nos resultados obtidos da estabilidade dos vinhos tratados com os poliaspartatos é possível verificar diferentes eficácias entre o PASP1 e o PASP2, sendo que com o primeiro se conseguem valores de variação da condutividade elétrica inferiores que com o segundo, obtendo-se melhores resultados do ponto de vista da estabilidade com o PASP1 do que com o PASP2, apesar deste último também ter conseguido deixar os vinhos estáveis.

O frio e a adição da manoproteína de acordo com os resultados do teste do mini contacto, foram os tratamentos menos eficazes. Com o tratamento pelo frio obtiveram-se resultados muito diferentes entre os vinhos, sendo que os vinhos V3 e V4 ficaram estáveis, o vinho V2 ficou em risco e o vinho V1 permaneceu instável. A baixa eficiência deste tratamento poderá estar relacionada com o tempo de refrigeração ter sido insuficiente para a total estabilização, bem como, com a temperatura do frigorífico ter sido demasiado elevada pois estava a 4,5°C e o aconselhado pela literatura é estar entre os 0 e os -4°C.

Já a adição da manoproteína às amostras de vinhos, nos vinhos V3 e V4, não estabilizou nenhum, quer na dose de 50 quer na dose de 100 mL/hL, sendo que as amostras do vinho V3 ficaram ambas instáveis e as do vinho V4 ficaram em risco, apesar de haver uma ligeira melhoria, ainda que insuficiente para garantir a estabilidade, com a dose de 100 mL/hL.

Na figura 16 é possível observar 4 gráficos de barra com os resultados do teste do mini contacto dos 4 vinhos, para os diferentes tratamentos efetuados, para que se possa comparar a eficácia destes na estabilização tartárica.

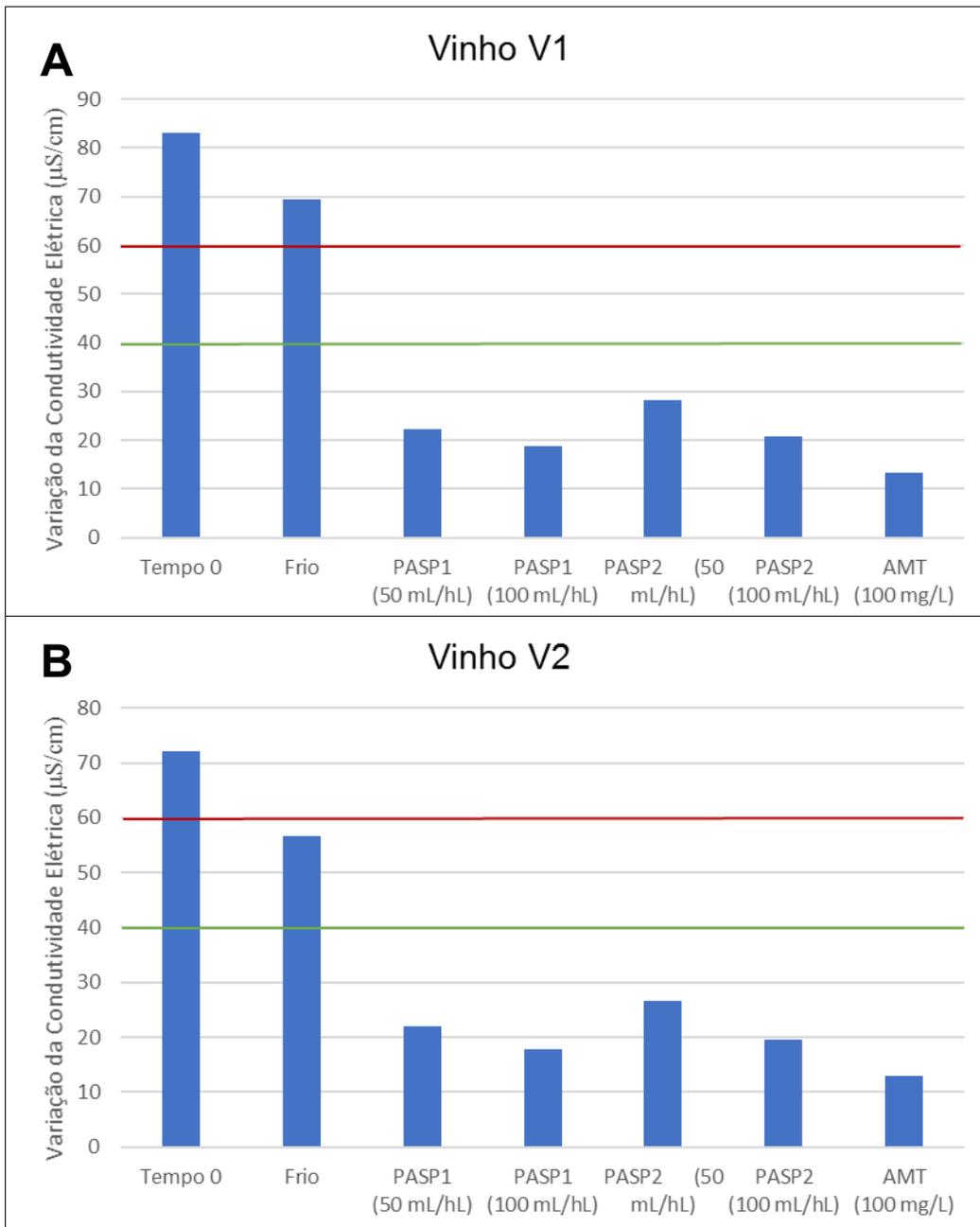


Figura 16. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho, antes e após os tratamentos de estabilidade tartárica. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.

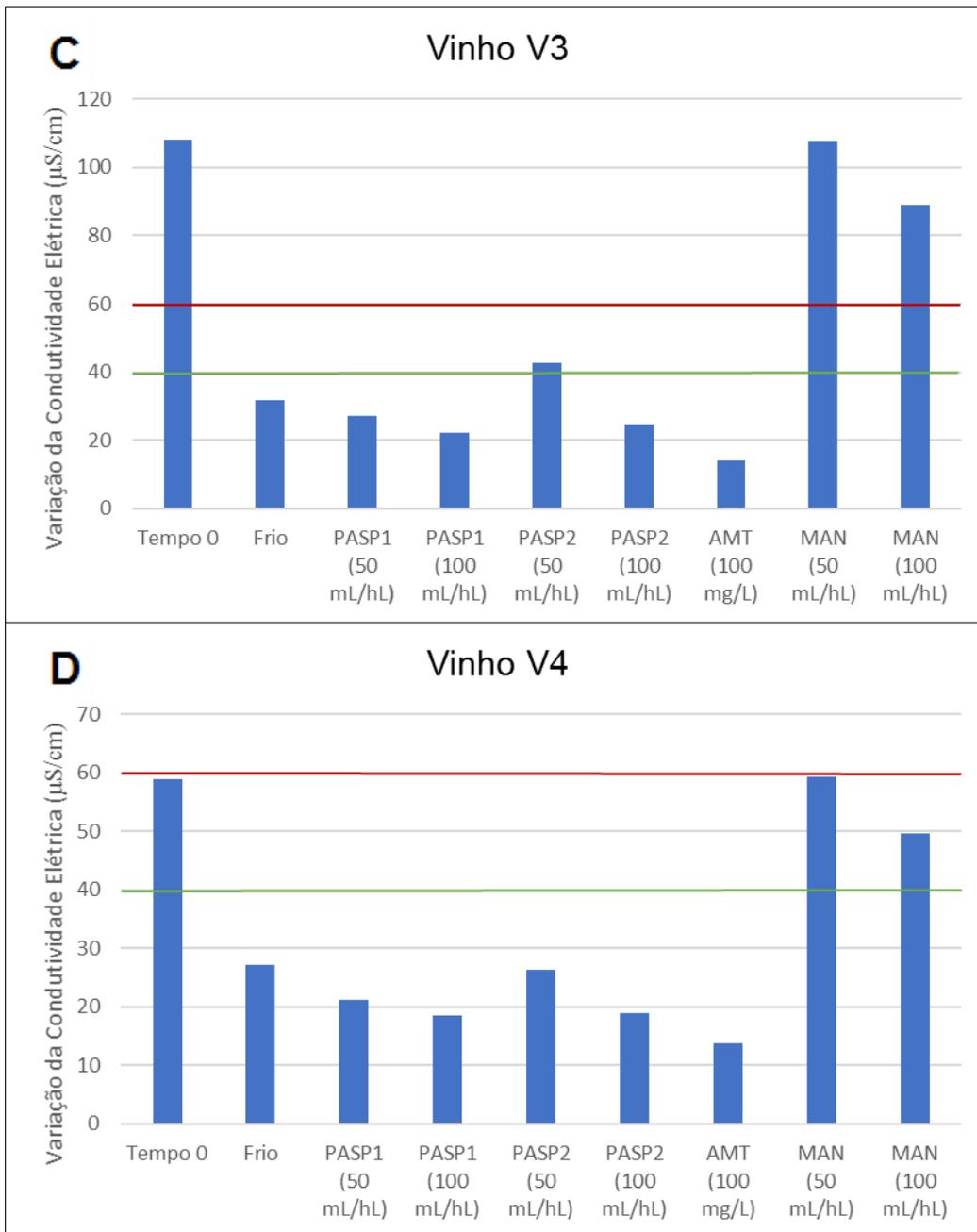


Figura 16 (continuação). Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho, antes e após os tratamentos de estabilidade tartárica. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.

10.3. Efeito do poliaspartato de potássio na estabilidade tartárica dos vinhos ao longo do tempo, comparativamente ao ácido metatartárico e à manoproteína

Os resultados obtidos pelo teste do mini contacto realizado após o envelhecimento acelerado das amostras de vinho, encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho depois do envelhecimento acelerado.

Vinhos	Variação da Condutividade Elétrica ($\mu\text{S/cm}$)						
	PASP1		PASP2		Ácido metatartárico	Manoproteína	
	Dose (mL/hL)		Dose (mL/hL)		Dose (mg/L)	Dose (mL/hL)	
	50	100	50	100	100	50	100
V1	52,15	33,85	77,25	46,2	120,65		
V2	48,25	32,75	56,85	43,45	127,05		
V3	72,3	43,4	120,35	72,9	158,5	143,05	135,8
V4	50	34,05	61	41,15	110,55	93,95	91,9

Pode observar-se que em todas as amostras de vinho colocadas na estufa, houve um acréscimo na variação da condutividade elétrica, o que se traduz numa diminuição da estabilidade tartárica.

Se por um lado o ácido metatartárico na experiência anterior, tinha sido o aditivo mais eficaz, com o envelhecimento acelerado este produto perdeu totalmente o seu efeito e os vinhos com ele tratados ficaram instáveis. Isto pode explicar-se pelas características do ácido metatartárico, uma vez que este se hidrolisa ao longo do tempo quando sujeito a temperaturas elevadas. Como os vinhos estiveram sujeitos durante dois meses a uma temperatura de 30°C, consegue-se perceber a perda da eficácia do produto.

Em relação aos poliaspartatos de potássio, mais uma vez a dose de 100 mL/hL mostrou ser mais eficaz que a dose de 50 mL/hL em ambos os produtos. O PASP1 teve um desempenho melhor que o PASP2 numa dose de 100 mL/hL,

continuando todos os vinhos estáveis, após o envelhecimento acelerado, à exceção do vinho V3 que ficou em risco, tendo sido este o vinho que desde o início mostrou uma maior instabilidade. Com o PASP2 na mesma dose, os vinhos V1, V2 e V4 ficaram em risco e o vinho V3 ficou instável, perdendo-se toda a estabilidade que se tinha alcançado antes da colocação das amostras na estufa.

A dose de 50 mL/hL, em ambos os poliaspartatos, não garantiu a estabilidade de nenhum vinho, ficando alguns deles instáveis e outros sob risco.

Já com as manoproteínas, os resultados do teste do mini contacto agravaram-se após o envelhecimento acelerado. Se anteriormente os vinhos com ela tratados estavam instáveis no caso do V3, e em risco no caso do V4, após o envelhecimento acelerado todos se demonstraram instáveis, não tendo havido nenhum progresso positivo. O facto de os vinhos não estarem estáveis do ponto de vista da estabilidade proteica pode ser a causa da ineficiência do tratamento.

Nos gráficos de barras seguintes, da figura 17, pode-se observar a variação da condutividade elétrica dos vinhos tratados com os diferentes aditivos, no tempo 1 e no tempo 2, verificando-se que em todos eles existiu um aumento deste valor após o envelhecimento acelerado, o que em alguns casos se traduziu numa perda de estabilidade.

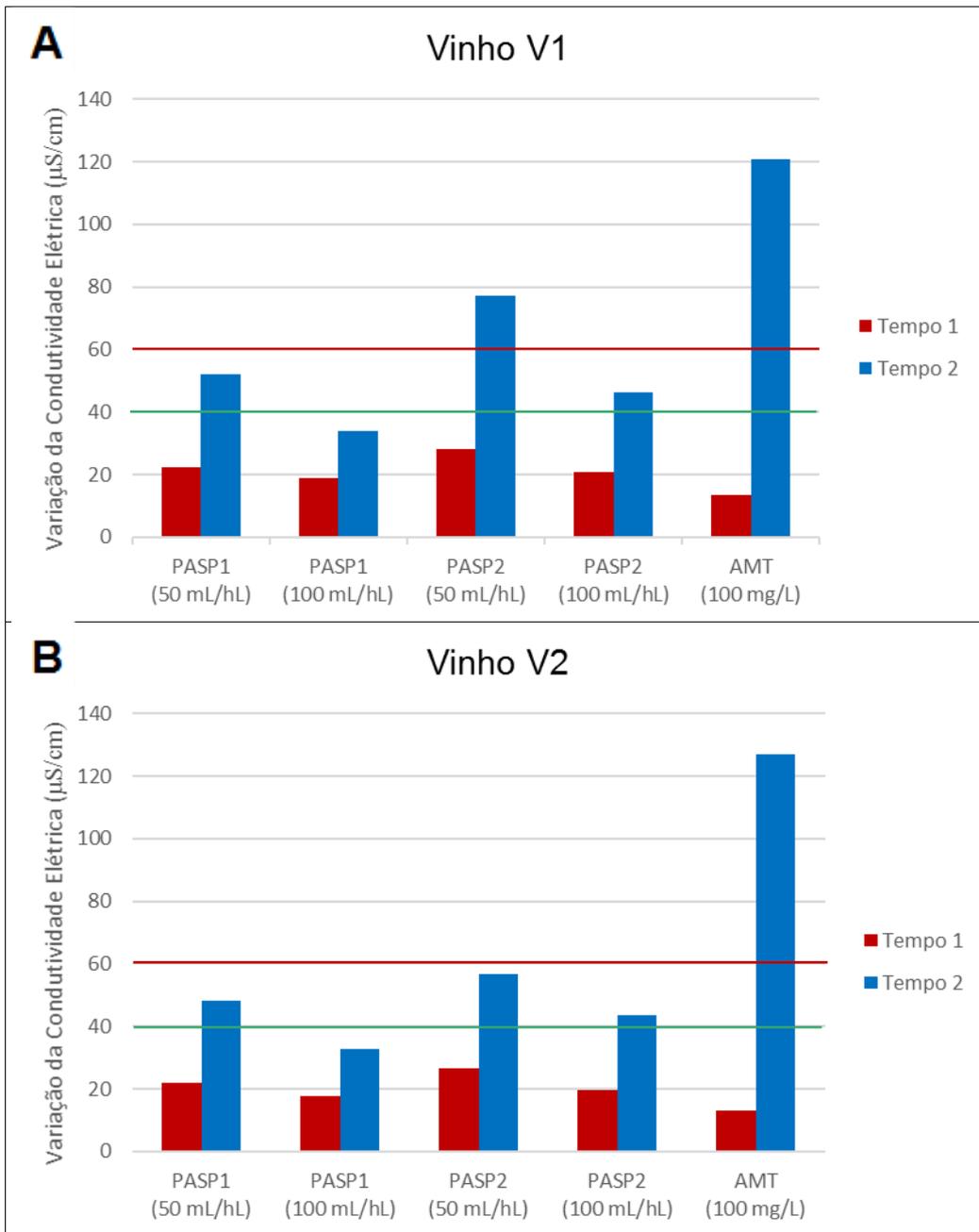


Figura 17. Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho após os tratamentos de estabilização tartárica, antes e depois do envelhecimento acelerado. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.

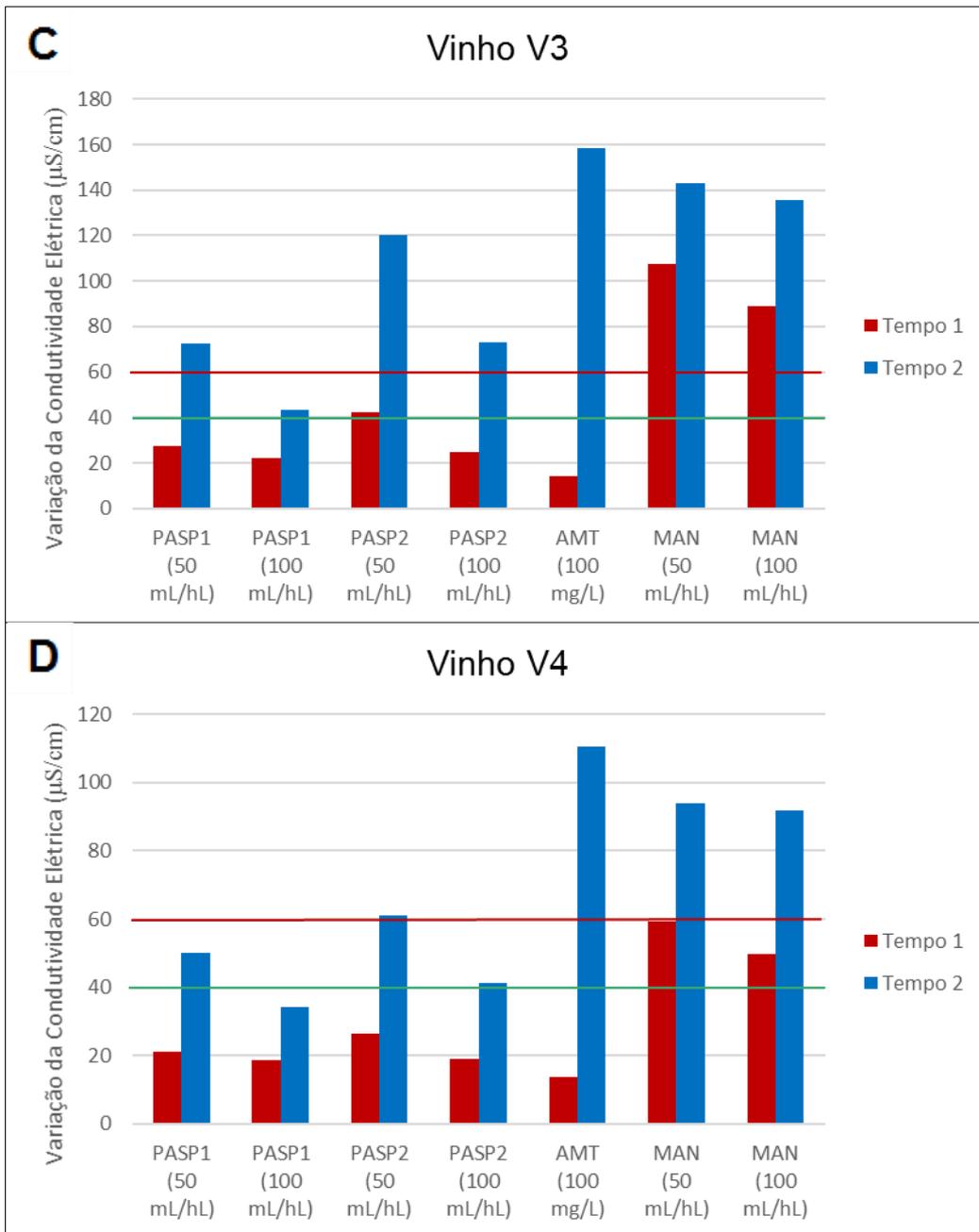


Figura 17 (continuação). Resultados do teste do mini contacto das amostras de vinho após os tratamentos de estabilização tartárica, antes e depois do envelhecimento acelerado. A- Vinho V1; B- Vinho V2; C- Vinho V3; D- Vinho V4.

10.4. Avaliação do teor em ácido aspártico ao longo do tempo

Os resultados obtidos por HPLC, relativos à concentração de ácido aspártico nos vinhos antes de serem submetidos aos diferentes tratamentos de estabilidade tartárica (tempo 0), e após o envelhecimento acelerado (tempo 2) dos vinhos tratados com PASP1, na dose de 100 mL/hL, encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Concentração de ácido aspártico (mg/L) nas amostras de vinho no tempo 0 e no tempo 2. Os valores são a média \pm desvio padrão das 3 amostras de cada vinho utilizadas na análise.

Vinhos	Concentração de ácido aspártico (mg/L)	
	Tempo 0	Tempo 2
V1	25,47 \pm 0,3	21,30 \pm 0,3
V2	30,68 \pm 6,5	30,70 \pm 8,3
V3	37,90 \pm 0,7	42,61 \pm 2,9
V4	41,13 \pm 3,9	59,63 \pm 0,1

Pela análise da tabela anterior percebe-se que a variação da concentração de ácido aspártico do tempo 0 para o tempo 2 não foi uniforme entre os vinhos, sendo que no vinho V1 houve um pequeno decréscimo da concentração, no vinho V2 a variação foi quase nula, e nos vinhos V3 e V4 ocorreu uma subida de concentração.

De facto, o que se pretendia verificar era se existia um aumento da concentração de ácido aspártico nos vinhos, devido à degradação do poliaspartato de potássio com o tempo. Os resultados obtidos não foram concludentes e não permitem inferir acerca do referido. Há que ter em conta que nesta experiência se utilizou um número de amostras limitado, apenas 4, recomendando-se em investigações futuras, acerca desta matéria, a utilização de um número de amostras diferentes mais vasto, de forma a que assim se consiga chegar a alguma conclusão em concreto.

Apesar disso, nos vinhos V3 e V4 verificou-se um aumento da concentração de ácido aspártico, o que pode indicar que o poliaspartato de potássio se degradou nestes vinhos durante o período desta experiência.

Na figura 18 é possível observar a evolução da concentração de ácido aspártico, nos 4 vinhos utilizados no estudo, do tempo 0 para o tempo 2, constatando-se o que já foi referido.

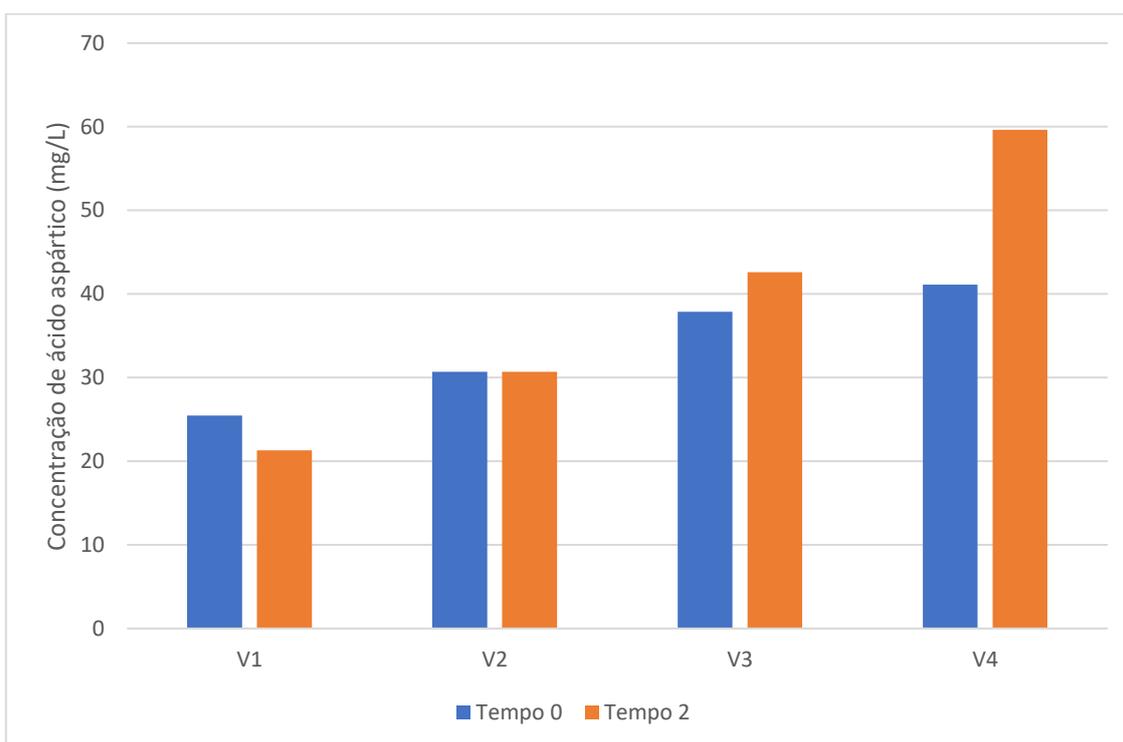


Figura 18. Concentração de ácido aspárticos (mg/L) nos vinhos V1, V2, V3 e V4 no tempo 0 e no tempo 2.

11. Conclusões

O poliaspartato de potássio mostrou ser um produto eficaz na estabilização tartárica de vinhos brancos, que permitiu diminuir a variação da condutividade elétrica dos vinhos do ensaio, tornando-os estáveis.

Apesar do ácido metatartárico ter uma eficácia superior neste tipo de estabilização, com os poliaspartatos de potássio utilizados conseguiu-se também deixar todos os vinhos tartaricamente estáveis. A dose de poliaspartato de potássio em que se obteve melhores resultados foi a de 100 mL/hL, conseguindo garantir que os vinhos ficassem todos muito estáveis, inclusive com valores de variação de condutividade elétrica próximos aos dos vinhos tratados com ácido metatartárico.

A utilização de manoproteínas não garantiu a estabilidade tartárica dos vinhos o que pode ser explicado pelo facto de estes não estarem estáveis do ponto de vista proteico. Já com o tratamento pelo frio obteve-se resultados de estabilidade muito heterogéneos, nos quais apenas 2 vinhos ficaram estáveis, sendo que com a utilização de temperaturas entre os 0 e os -4°C, como refere a literatura, e prolongando o tratamento um pouco mais, talvez os resultados tivessem sido mais positivos.

Conclui-se ainda que o poliaspartato de potássio apresenta uma vantagem em relação ao ácido metatartárico, uma vez que mantém a sua eficácia ao longo do tempo quando sujeito a temperaturas mais elevadas, neste caso a 30°C. De facto, a dose de 100 mL/hL de PASP1, garantiu a estabilidade de todos os vinhos, tendo apenas 1 ficado em risco de instabilidade, ao contrário do ácido metatartárico em que todos os vinhos com ele tratados ficaram instáveis. Assim em vinhos brancos que não são para consumir num curto período de tempo, mas sim para envelhecer, o poliaspartato de potássio poderá ser uma boa alternativa.

Em relação à degradação do poliaspartato de potássio em ácido aspártico com o envelhecimento acelerado nos vinhos tratados com o PASP1, na dose de 100 mL/hL, os resultados não foram conclusivos uma vez que houve vinhos em que a concentração deste aminoácido aumentou e houve um em que diminuiu ligeiramente, sugerindo-se estudos futuros, com um maior número de amostras,

para o estudo mais aprofundado acerca deste efeito. Apesar disso, os resultados sugerem que houve degradação de poliaspartato de potássio nos 2 vinhos em que a concentração de aspartato aumentou (V3 e V4), o que pode explicar a diminuição da estabilidade destes vinhos após o envelhecimento acelerado.

12. Referências Bibliográfica

Araújo, J.M.A., 2004. Química dos alimentos. Teoria e prática. 3ª edição. Editor UFV, Viçosa, Brasil.

Bajul, A., Gerbaud, V., Teychene, S., Devatine, A., Bajul, G., 2017. Effect of carboxymethylcellulose on potassium bitartrate crystallization on model solution and white wine. *Journal of Crystal Growth*, 472: 54-63.

Bosso, A., 2015. Nuovi additivi per la stabilizzazione tartarica: il Progetto STABIWINE. *Il Corriere Vinicolo*, 21: 28-29.

Bosso, A., Panero, L., Petroziello, M., Sollazzo, M., Asproudi, A., Motta, S., Guaita, M., 2015. Use of polyaspartate as inhibitor of tartaric precipitations in wines. *Food Chemistry*, 185: 1-6.

Bosso, A., Salmaso, D., De Faveri, E., Guaita, M., Franceschi, D., 2010. The use of carboxymethylcellulose for the tartaric stabilization of white wines, in comparison with other oenological additives. *Vitis*, 49: 95-99.

Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R., 1999. Principles and Practises of Winemaking. Springer Science+Bussiness Media, Inc., Nova Iorque.

Cabrita, M.J., Garcia, R., Catarino, S., 2016. Recent Developments in wine tartaric stabilization. Em: Jordão, A.M., Cosme, F., Recent Advances in Wine Stabilization and Conservation Technologies, Nova Science Publishers Inc., Nova Iorque.

Corti, S.V., Paladino, S.C., 2016. Estabilización tartárica en vinos: comparación entre electrodiálisis y tratamiento de frío por contacto. *Revista FCA UNCUYO*, 48: 225-238.

Costa, J., 2015. Validação de um método de cromatografia de alta eficiência para determinação de conservantes em géneros alimentícios. Tese de mestrado de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa.

Coulter, A.D., Holdstock, M.G., Cowey, G.D, Simos, C.A., Smith P.A., Wilkes E.N., 2015. Potassium bitartrate crystallisation in wine and its inhibition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21: 627–641.

Curvelo-Garcia, A.S., Barros, P., 2015. Química Enológica – métodos analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas. Publindústria, Edições Técnicas, LDA, Porto.

Dubourdieu, D., Moine-Ledoux, V., 2007. Propriedades y características de manoproteínas extraídas de leveduras. Enoforum 2007, Piacenza.

European Food Safety, 2016. Safety of potassium polyaspartate (A-5D K/SD) for use as a stabiliser in wine. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA Journal*, 14 (3): 4435.

Gerbaud, V., Gabas, N., Blouin, J., Crachereau, C., 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*, 44 (4): 231-242.

Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E., 2007. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55: 608-613.

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 for white wine tartaric stabilization. *Food Chemistry*, 156: 250-257.

Jackson, R.S., 2000. Wine Science, 2ª edition, Principles, Practise, Perception. Elsevier Science & Technology Books, San Diego.

Lasanta, C., Gómez, J., 2012. Tartrate stabilization of wines. *Trends in Food Science & Technology*, 28: 52-59.

Margalit, Y., 2012. Concepts in wine chemistry. Third Edition. The Wine Appreciation Guild, São Francisco.

Morello, A., 2012. Influence of pH and Temperature on Metatartaric Acid Efficiency in White Wine Tartaric Stabilization. Tese de mestrado de Viticultura e Enologia, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

OIV (2014). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Office International de la Vigne et du Vin, Paris.

OIV, 2016. Tratamiento com Poliaspartato de Potasio – Vino. Resolução OIV-OENO 543-2016.

OIV, 2019a. International Code of Oenological Practices. International Organization of Vine and Wine, Paris.

OIV, 2019b. International Oenological Codex. International Organization of Vine and Wine, Paris.

Rayess, Y.E., Azzi-Achkouty, S., Rizk, Z., Ghanem, C., Nehme, N., 2016. Clarification and stabilization of wines using membrane processes. Em: Jordão, A.M., Cosme, F., Recent Advances in Wine Stabilization and Conservation Technologies, Nova Science Publishers Inc., Nova Iorque.

Regulamento (CE) n.º 491/2009 do Conselho de 25 de maio de 2009 que altera o Regulamento (CE) n.º 1234/2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «OCM única»). Jornal Oficial da União Europeia.

Regulamento (CE) n.º 606/2009 da Comissão de 10 de julho de 2009, que estabelece as regras de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis. Jornal Oficial da União Europeia.

Regulamento (UE) n.º 2017/1399 da Comissão, de 28 de julho de 2017, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo do Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão no que diz respeito ao poliaspartato de potássio. Jornal Oficial da União Europeia.

Regulamento Delegado (UE) n.º 2017/1961 da Comissão, de 2 de agosto de 2017, que altera o Regulamento (CE) n.º 606/2009 no respeitante a determinadas práticas enológicas. Jornal Oficial da União Europeia.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 1998. Traité D'œnologie : Tome 2, Chimie du vin, Stabilisation et Traitements. Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D., 2006. Handbook of Enology - Volume 2- The Chemistry of Wine - Stabilization and Treatments. 2ª Edição. John Wiley & Sons, Ltd, Inglaterra.

Rizzon, L.A. & Sganzerla, V.M.A. (2007). Ácidos tartárico e málico no mosto de uva, em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural – Santa Maria*, 37 (3): 911-914.

Rodrigues, A., Ricardo-Da-Silva, J.M., Lucas, C., Laureano, O., 2012. Influence of Fining and Tartaric Stabilisation Procedures on White Wine Mannoprotein Content. South African. *Journal for Enology and Viticulture*, 33: 88-94.

Santos, P.C., Pereira, O.M., Gonçalves, F., 2000. Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: estudo comparativo da eletrodialise e um método tradicional. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 15: 95-108.

Sanz, D.S., 2012. Revisión sobre técnicas actuales de estabilidad tartárica en los vinos. Tese de mestrado de Qualidade, Desenvolvimento e Inovação de Alimentos, Universidade de Valladolid, Escola Técnica Superior de Engenharias Agrárias de Palencia, Espanha.

Simões, M., Catarino, S., Cabrita, M.J., 2013. A estabilização tartárica de vinhos. Livro de atas, Volume 1, do 9º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora, 93-100.

Sprenger, S., Hirn, S., Dietrich, H., Will, F., 2015. Metatartaric acid: physicochemical characterization and analytical detection in wines and grape juices. *European Food Research and Technology*, 241: 785-791.

Triulzi, G., Montagner, C., Scotti, B., 2015. Stabilizzazione tartarica senza l'utilizzo del freddo: La tecnica aditiva si evolve e nasce l'applicazione enologica del poliaspartato di potássio. *L'Enologo*, 11: 79-84.

Wang, Y., Ye, D. Zhu, B., Wu, G., Duan, C., 2014. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*, 163: 6-15.

13. Anexos

13.1. Resultados obtidos por HPLC

Os valores relativos ao tempo de retenção e à área dos picos do ácido aspártico e do padrão interno, que foram retirados do cromatogramas obtidos por HPLC e que permitiram o cálculo da concentração de ácido aspártico dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo, encontram-se nas tabelas seguintes.

Na tabela 13 podem observar-se estes valores nas amostras de vinhos antes de terem sido sujeitas a qualquer tipo de tratamento (tempo 0). Já na tabela 14, os valores são relativos às amostras do ensaio que foram tratadas com o poliaspartato de potássio PASP1, na dose de 100 mL/hL, depois do envelhecimento acelerado (tempo 2).

Tabela 13. Tempo de retenção (minutos) e área dos picos do aspartato e do padrão interno, obtidos por HPLC, de amostras dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo, antes de serem submetidos a qualquer tipo de tratamento.

Vinhos	Amostras	Compostos	Tempo de retenção (minutos)	Área
V1	1	Aspartato	4.114	178064
		Padrão interno	13.163	1197560
	2	Aspartato	4.106	160006
		Padrão interno	13.088	1026883
	3	Aspartato	4.131	169453
		Padrão interno	13.079	1039306
V2	1	Aspartato	4.139	197220
		Padrão interno	13.078	866034
	2	Aspartato	4.132	202844
		Padrão interno	13.089	1302381
	3	Aspartato	4.189	552740
		Padrão interno	13.113	1225197
V3	1	Aspartato	4.129	471417
		Padrão interno	13.105	1100663
	2	Aspartato	4.124	560682
		Padrão interno	13.064	1233465
	3	Aspartato	4.116	504860
		Padrão interno	13.055	1100290
V4	1	Aspartato	4.112	679567
		Padrão interno	13.009	1098552
	2	Aspartato	4.114	653785
		Padrão interno	13.013	1504017
	3	Aspartato	4.112	592236
		Padrão interno	13.043	1142489

Tabela 14. Tempo de retenção (minutos) e área dos picos do aspartato e do padrão interno, obtidos por HPLC, de amostras dos 4 vinhos brancos utilizados no estudo tratados com PASP1, numa dose de 100mg/L, após o envelhecimento acelerado.

Vinhos	Amostras	Compostos	Tempo de retenção (minutos)	Área
V1	1	Aspartato	4,159	64091
		Padrão interno	13,303	1111073
	2	Aspartato	4,155	64878
		Padrão interno	13,288	1290455
	3	Aspartato	4,159	71035
		Padrão interno	13,28	1079444
V2	1	Aspartato	4,155	64362
		Padrão interno	13,234	1216543
	2	Aspartato	4,34	478173
		Padrão interno	13,247	1269526
	3	Aspartato	4,34	446080
		Padrão interno	13,223	1097473
V3	1	Aspartato	4,34	455462
		Padrão interno	13,121	948501
	2	Aspartato	4,34	545387
		Padrão interno	13,089	926735
	3	Aspartato	4,34	547054
		Padrão interno	13,138	901159
V4	1	Aspartato	4,34	652962
		Padrão interno	12,908	669127
	2	Aspartato	4,34	654213
		Padrão interno	12,792	675851
	3	Aspartato	4,34	668139
		Padrão interno	12,779	716874