



**Vânia Sofia Alves de
Sousa Mello**

**Estudo da eletrodialise na composição catiónica de
um vinho ao longo da vinificação**



**Vânia Sofia Alves de
Sousa Mello**

**Estudo da eletrodialise na composição catiónica de
um vinho ao longo da vinificação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, pós-doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, co-orientação do Doutor Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa, responsável pela direção de Investigação e Desenvolvimento da Proenol, Industria Biotecnologica, Lda e co-orientação do Engenheiro Francisco Nuno Peres Jorge Antunes, responsável pela direção do departamento de Enologia da Aliança- Vinhos de Portugal, S.A.

A nós, Mãe.

o júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Professora Doutora Maria Eduarda Pereira
Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Doutora Cláudia Nunes pela disponibilidade, apoio e orientação dada ao longo desta dissertação.

Ao Engenheiro Francisco Antunes e ao Engenheiro Filipe Centeno, pela oportunidade dada e pelo apoio e defesa dos meus interesses ao longo desta caminhada.

A todas as pessoas que conheci tanto na Aliança como na Proenol.

Aos meus amigos, à minha mãe.

palavras-chave

Vinho espumante, Castelão, Periquita, catiões, *Saccharomyces cerevisiae*, produtos enológicos, eletrodialise

resumo

A produção de um vinho espumante, segundo o método Champanhês, consiste na produção de um vinho base, a partir do qual se realiza uma segunda fermentação alcoólica em garrafa pela adição de leveduras e açúcar com produção de CO₂. A eletrodialise é um processo usado para a estabilização tartárica do vinho base, que consiste na remoção de iões, tais como potássio e hidrogeno tartarato, de forma a evitar a formação de precipitados, durante a vinificação e armazenamento do vinho. Porém, este processo pode levar à remoção de outros iões que são essenciais para o crescimento da levedura *S. cerevisiae* durante a segunda fermentação alcoólica, para a produção de vinho espumante.

O primeiro objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o impacto da eletrodialise nos parâmetros enológicos nos vinhos base para espumante e na sua composição em catiões, tais como potássio, magnésio, manganês, cálcio, cobre, ferro, zinco, molibdénio e cobalto. O segundo objetivo do trabalho foi avaliara influência nas características físico-químicas e sensoriais do vinho da adição de produtos enológicos, constituídos por extratos de levedura inativa, como suplementos durante a primeira e segunda fermentação.

Dois vinhos espumantes brancos, um fermentado com adição de produto enológico e outro sem adição de qualquer produto, foram analisados ao longo do processo de vinificação, em parâmetros como teor alcoólico, pH, acidez volátil, acidez total, massa volúmica, conteúdo de extrato seco, dióxido de enxofre livre e total, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais e turbidez. O seu conteúdo em catiões antes e após o tratamento por eletrodialise foi também determinado. Após a obtenção destes dois vinhos base e antes da segunda fermentação, a cada vinho foram novamente adicionados, dois produtos enológicos diferentes. Vinhos espumantes sem adição destes produtos foram também produzidos para serem usados como controlo. Os níveis de catiões foram novamente determinados após a adição destes produtos. Todas as variedades de vinho espumante produzidos foram sujeitos a uma prova organolética.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que a eletrodialise não afeta os vinhos nos diferentes parâmetros enológicos analisados. No entanto, a eletrodialise diminuiu significativamente as concentrações de alguns catiões, magnésio, manganês, zinco e cobalto. A adição do produto enológico na primeira fermentação não teve qualquer influência nos níveis minerais do vinho base. A adição dos produtos enológicos ao vinho base como suplementos de catiões antes da segunda fermentação aumentou os níveis de cobre e cobalto num vinho, e de potássio, magnésio, cobre e cobalto no outro vinho.

A análise sensorial aos vinhos mostrou que a adição dos produtos enológicos diminuiu a tonalidade amarela aumentando a verde, aumentou o carácter frutado dos vinhos. Em relação à espuma, a adição de qualquer um dos produtos enológicos aumentou o potencial de espuma dos vinhos.

keywords

Sparkling wine, Castelão Periquita, cations, *Saccharomyces cerevisiae*, second fermentation in the bottle, electro dialysis

abstract

The production of sparkling wine, according to the *champagne* method consists in the production of a base wine, from which is carried a second fermentation in bottle by the addition of yeast and sugar. The electro dialysis is a process used for the tartaric stabilization of wine, which consists in removing ions, such as potassium and hydrogen tartrate, in order to prevent the occurrence of precipitates during vinification and wine storage. However, this process may lead to the removal of other ions that are essential for *S. cerevisiae* growth during the second fermentation for sparkling wine production

The first objective of this study was to assess the impact of electro dialysis in the base wine oenological parameters and their composition on cations like potassium, magnesium, manganese, calcium, copper, iron, zinc, molybdenum, and cobalt. The second objective was to evaluate the addition of two oenological products, composed by inactive yeast extracts, in the physico-chemical and sensorial properties of the sparkling wine.

Two white sparkling wines, one fermented without the addition of oenological product, and another with the oenological product addition before the first alcoholic fermentation, were analyzed throughout the winemaking process, on parameters such as alcohol content, pH, volatile acidity, total acidity, density, dry matter content, free and total sulfur dioxide, antioxidant activity and total phenolic compounds and turbidity. The content of cations before and after electro dialysis treatment was also determined. After obtaining these two base wines, each wine was used to produce two different sparkling wines by the addition of two different oenological products. Sparkling wines without addition of these products have also been produced to be use as control. The cations content were determined after the addition of these products. All varieties of sparkling wine produced were subjected to sensorial analysis.

The results obtained allow to concluded that the electro dialysis does not affect the oenological parameters of the wines. However, the treatment significantly reduced the concentrations of some elements such as magnesium, manganese, zinc, and cobalt. The addition of oenological product in the first fermentation had no influence on the mineral levels of the base wine The addition of oenological products to the base wine for sparkling wine production, as ions supplements before the second fermentation, increased copper and cobalt levels in one wine, and potassium, magnesium, copper and cobalt in the other wine.

A sensorial analysis of the wines showed that the addition of oenological products decreased the yellow tone increasing the green one, increased the fruity character of the wines. Regarding the foam, the addition of any of the oenological product increased foam potential of the wines.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
ABREVIATURAS	XIII

I. Introdução	1
1. O vinho espumante	3
1.1. Uvas usadas na produção de vinho espumante	3
1.2. O processo de vinificação de vinho espumante	4
1.2.1. Produção de vinho base.....	5
1.2.2. Segunda fermentação	6
1.2.2.1. Problemas na segunda fermentação na produção de vinho espumante.....	7
1.2.2.2. Os metais no metabolismo da levedura.....	9
2. Ácidos orgânicos no vinho	14
2.1. O Ácido Tartárico.....	15
2.1.1. Fatores que influenciam a cristalização do hidrogeno tartarato de potássio	17
3. Estabilização tartárica.....	18
3.1. Troca iônica.....	18
3.2. Ácido metatartárico	19
3.3. Manoproteínas	19
3.4. Carboximetilcelulose.....	20
3.5. Estabilização por frio	20
3.6. Eletrodialise.....	22
3.6.1. Vantagens da eletrodialise.....	24
II. Objetivos.....	25
III. Materiais e métodos	29
1. Produção de vinho espumante	31
2. Análises físico-químicas.....	37
2.1. Determinação da estabilidade tartárica	37
2.2. Análise dos parâmetros enológicos	38
2.3. Determinação dos compostos fenólicos totais	41
2.4. Determinação da atividade antioxidante	42
2.5. Análise da composição em catiões.....	43
3. Análises estatísticas	43
4. Análise sensorial.....	43
IV. Resultados e Discussão.....	45
1. Determinação da estabilidade tartárica do vinho base.....	47

2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo da vinificação do vinho base	51
2.1. Teor Alcoólico.....	51
2.2. pH.....	52
2.3. Acidez total	53
2.4. Acidez volátil	54
2.5 Massa volúmica.....	55
2.6 Dióxido de enxofre livre e total.....	56
2.7. Turbidez	58
3. Compostos fenólicos	60
3.1. Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu	60
3.2. Atividade antioxidante	61
4. Análise dos catiões	62
5. Produção do vinho espumante	68
5.1. Segunda fermentação em garrafa	68
5.2. Análise dos iões nos vinhos espumantes.....	71
5.3. Análise sensorial	74
V. Conclusão	79
VI. Bibliografia	85
VII. Anexos.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Uvas da casta Castelão e a região da Estremadura em Portugal.....	4
Figura 2 - Via da glicólise e da fermentação alcoólica.	11
Figura 3 - Centro ativo da enzima álcool desidrogenase.	13
Figura 4 - Estruturas químicas dos ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico.....	14
Figura 5 - Hidrogênio tartarato de potássio.....	15
Figura 6 - Distribuição de espécies de tartarato no vinho em função do pH.....	15
Figura 7 - Tipos de nucleação.	16
Figura 8 - Tartarato neutro de cálcio.....	17
Figura 9 - Esquema de um empilhamento de eletrodialise e detalhe de uma membrana catiónica.	22
Figura 10 - Instalação de eletrodialise.	33
Figura 11 - Esquema dos ensaios realizados na tiragem para a obtenção do vinho espumante.	34
Figura 12 - Esquema geral do processo de vinificação.....	36
Figura 13 - Teores alcoólicos dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW ao longo do processo de vinificação.....	51
Figura 14 - Variação do pH dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	52
Figura 15 - Variação da acidez total dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	54
Figura 16 - Variação da acidez volátil dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	55
Figura 17 - Variação da A) massa volúmica e do B) extrato seco dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	56
Figura 18 - Variação do A) sulfuroso livre e B) sulfuroso total dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	57
Figura 19 - Variação da turbidez dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.	59
Figura 20 - Evolução dos compostos fenólicos totais (expressos em mg/L eq. ácido gálico) dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	60
Figura 21 - Evolução da atividade antioxidante (expresso em % de inibição) dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW ao longo da vinificação, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	61
Figura 22 - variação do potássio em A) Aliança e B) LCA, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	62
Figura 23 - variação do teor em cálcio determinado na A)Aliança e no B)LCA, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	63
Figura 24 - variação do teor de sódio na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	64
Figura 25 - variação do teor de fe na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	65
Figura 26 - variação do teor de cobre na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	65
Figura 27 - Conteúdo em A) magnésio, B) manganês, C) zinco e D) cobalto, antes e após o tratamento de eletrodialise, determinados no Laboratório Central de Análises, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	66
Figura 28 - Cinéticas fermentativas ($T=14^{\circ}\text{C}$) pelas leveduras imobilizadas no vinho Affinity. ...	69

Figura 29 - Cinéticas fermentativas (T=14°C) pelas leveduras imobilizadas no vinho Affinity+OPMW.	69
Figura 30 - Resultados do parâmetro “cor” da prova organolética.	74
Figura 31 - Resultados do parâmetro “aroma” da prova organolética.	75
Figura 32 - Resultados do parâmetro “sabor” da prova organolética.....	75
Figura 33 - Apreciação global dos vinhos em prova.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais variedades utilizadas para a elaboração de espumantes pelo método clássico distribuídas por regiões climáticas.	3
Tabela 2 - Metais essenciais para o crescimento e funções metabólicas das leveduras <i>S. cerevisiae</i>	9
Tabela 3 - Funções do zinco na fisiologia da levedura.	12
Tabela 4 - Resultados do teste D.I.T.	48
Tabela 5 - Condutividade dos vinhos ao longo de 4 h e os coeficientes de conversão calculados.	49
Tabela 6 - Condutividade dos vinhos durante 120 min a -4°C.	50
Tabela 7 - Comparação dos valores de minerais dos vinhos em estudo e das concentrações necessárias para o crescimento celular e reprodução das <i>S. cerevisiae</i> , em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$	67
Tabela 8 - Determinação dos açúcares redutores nos vinhos espumantes	70
Tabela 9 - Pressão de CO ₂ nos produtos finais dos ensaios.	71
Tabela 10 - Quantidade de cátions presentes nos vinhos com adição dos produtos enológicos OPMW e OPTIRED para o vinho Affinity, em que letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes para $p < 0,05$	72
Tabela 11 - Representação da análise dos cátions com adição dos produtos enológicos OPMW e OPTIRED para o vinho Affinity+OPMW, em que letras diferentes representam $p < 0,05$	73
Tabela 12 - Parâmetros avaliados na caracterização da espuma.	76

ABREVIATURAS

ABS	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
MA	Membrana aniónica
ATP	Adenosina trifosfato
CaT	Tartarato neutro de cálcio
MC	Membrana Catiónica
CMC	Carboximetilcelulose
D.I.T.	Grau de instabilidade tartárica (<i>Degrée d'Instabilité Tartrique</i>)
ED	Eletrodiálise
Fc	Fator de correção
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HT⁻	Anião hidrogeno tartarato
HTK	Hidrogeno tartarato de potássio
ISTC50	Índice de estabilidade tartárica (<i>Index de Stabilité Tartaric Critique</i>)
LCA	Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro
MP	Manoproteína
MTA	Ácido metatartárico
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NIR	Espectrometria de infravermelho próximo
OIV	Organização internacional da vinha e do vinho
OMS	Organização mundial de saúde
OPMW	Produto enológico OptimumWhite
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

I. Introdução

I. Introdução

1. O vinho espumante

O termo espumante aplica-se a vinhos cuja efervescência resulta de uma fermentação alcoólica conduzida em recipiente fechado. A produção de um vinho espumante pode ser realizada vários métodos, sendo os mais comuns o *charmat* e o clássico ou *champenoise*. A elaboração de um vinho espumante através destes métodos, é sempre dividida em duas grandes fases: a produção de um vinho base e a produção de dióxido de carbono resultante de uma segunda fermentação em recipiente fechado (cubas de aço no método *charmat*, e em garrafa no método *champenoise*). (1)

Já no método *asti* ou moscatel, o espumante é produzido numa única fermentação, não se elaborando o vinho base e partindo-se da primeira fermentação a partir do mosto das uvas. A fermentação é interrompida quando a graduação de açúcares naturais da uva está entre 65g/L a 80g/L, resultando em um espumante de graduação alcoólica mais baixa (7 a 7,5 %), e de grande expressão aromática. (2)

1.1. Uvas usadas na produção de vinho espumante

As principais variedades de uvas utilizadas para a elaboração de espumantes pelo método clássico ou *champenoise*, em todo o mundo estão indicadas na Tabela 1 de acordo com o tipo de clima. (1,3)

Tabela 1 - Principais variedades utilizadas para a elaboração de espumantes pelo método clássico distribuídas por regiões climáticas.

Regiões frias	Regiões moderadas	Regiões quentes
<i>Pinot Noir</i>	<i>Chenin Blanc</i>	<i>Parellada</i>
<i>Pinot Meunier</i>	<i>Chardonnay</i>	<i>Chardonnay</i>
<i>Pinot Blanc</i>	<i>Gamay</i>	<i>Xarello</i>
<i>Chardonnay</i>	<i>Pinot Noir</i>	<i>Pinot Noir</i>
<i>Gamay</i>	<i>Pinot Meunier</i>	<i>Chenin Blanc</i>
	<i>Moscato Giallo</i>	<i>Pinot Meunier</i>
		<i>Semillon</i>
		<i>Macabeo</i>

Introdução

Em Portugal há uma enorme variedade de castas autóctones, uma delas a casta Castelão ou Periquita oriunda da região da Estremadura (Figura 1) que é, a nível nacional, a região com maior produção de vinho e maior área de vinha. (3)

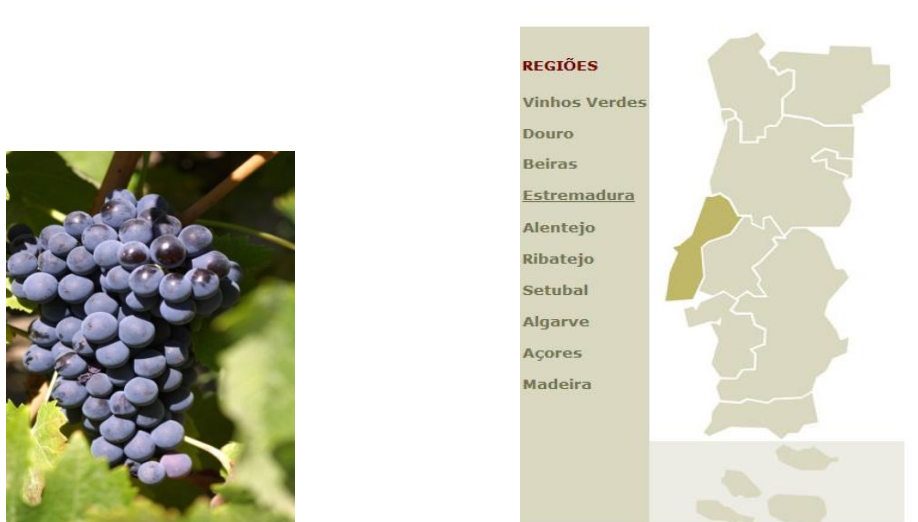


Figura 1 - Uvas da casta Castelão e a região da Estremadura em Portugal.

Castelão é uma das castas tintas cultivadas no sul do país e desenvolve-se melhor em climas quentes e solos arenosos e secos. Os vinhos produzidos com esta casta possuem uma intensidade de cor média (rubi), são concentrados, aromáticos (framboesa e groselha) e com boas condições para envelhecer. O cacho é pequeno e compacto, com bago de tamanho médio, uniforme, de forma arredondada, cor negro-azul, com película espessa, rija e pouco suculenta, com sabor indefinido. (4)

1.2. O processo de vinificação de vinho espumante

O método Champanês é o mais utilizado na produção de vinho espumante, de seguida encontram-se descritas as etapas da elaboração de vinhos espumantes por este processo. (2)

1.2.1. Produção de vinho base

Na produção de um vinho base para espumante usam-se uvas menos maduras (álcool provável inferior a 11%) quando em comparação com as uvas usadas para a produção de um vinho de mesa, pois pretende-se produzir um vinho com maior acidez. As uvas são desengaçadas e prensadas para obter o mosto. As primeiras prensagens produzem o mosto de primeira qualidade, o *cuvée*, rico em açúcares e ácido málico e tartárico. Prensagens adicionais produzem os vinhos de “segunda prensagem” ou *taille*, rico em açúcares, com teor de ácido menor e conteúdo em minerais elevado (principalmente sais de potássio). (5)

Ao mosto é adicionado dióxido de enxofre, 40 e 50 mg/L para o *cuvée* e entre 50 e 80 mg/L para o *taille*, tendo como objetivo o impedimento do desenvolvimento de microrganismos prejudiciais ao vinho e a ação como agente antioxidante. (6)

O processo subsequente é a clarificação, onde se adiciona uma substância capaz de efetuar uma ligação iônica com partículas em suspensão. O agente de clarificação é essencial para remover proteínas, ao pH a que se encontra o vinho, as proteínas têm carga positiva, o que permite a sua remoção por agentes inorgânicos como a bentonite, carregado negativamente. Normalmente, este produto é usado em concentrações entre 25 e 30 g/hL, o suficiente para fixar a proteína instável presente no mosto. (7)

Após a etapa de clarificação são adicionadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas ao mosto e a fermentação alcoólica decorre com temperatura controlada entre 15 e 18 °C. A cinética de fermentação é acompanhada pela medição da densidade e que se inicia com valores de 1,090 g/mL e decresce até 0,995 g/mL no final da fermentação, onde se consideram que todos os açúcares foram fermentados. A densidade constitui uma medida aproximada da quantidade de glucose e frutose contida no mosto, sendo que à medida que decorre a fermentação, vai havendo degradação destes açúcares e formação de álcool, com consequente diminuição da densidade. (6)

Depois de finalizada a fermentação, realiza-se uma filtração que tem de assegurar a qualidade do vinho já que as partículas têm de ser retidas sem qualquer alteração no sabor. Há vários tipos de filtração, que incluem fibras de celulose, membranas sintéticas e filtração tangencial, a técnica mais usada devida à facilidade de operação. (5) Efeitos hidrofóbicos podem ocorrer entre os taninos e as regiões não polares das proteínas. Além disso, as características das proteínas (composição em aminoácidos, estrutura, dimensão, carga),

desempenham obviamente um papel importante nestas reações, por exemplo, proteínas com alto teor de prolina têm uma grande afinidade para taninos. Assim estes processos, clarificam o vinho filtrando-o e retirando proteína em excesso de modo a evitar a formação destes complexos que precipitam. (21)

A última etapa, antes de engarrafar, é a estabilização tartárica do vinho base. Esta estabilização pode ocorrer pela cristalização do tartarato de potássio através da estabilização por frio (por colocação do vinho a temperaturas abaixo de 0°C), pela remoção de hidrogênio tartarato e potássio usando membranas de eletrodialise, uso de permutadores iônicos; ou ainda através de métodos que utilizam aditivos, como a adição de ácido metatartárico, manoproteínas ou carboximetilceluloses. (8) A estabilização por frio e a eletrodialise são as opções mais usadas uma vez que se evita a adição de aditivos ao vinho. (6)

1.2.2. Segunda fermentação

A segunda fermentação ocorre em garrafa, sendo adicionado o licor de tiragem constituído por mosto *cuvée*, leveduras selecionadas *S. cerevisiae*, fosfato de diamónio e tiamina, e sacarose na quantidade requerida para o crescimento da levedura para atingir na fermentação a pressão de CO₂ de 6 atm (aproximadamente 24 g/L de açúcar). (4)

Depois da adição do licor de tiragem, as garrafas são empilhadas horizontalmente para decorrer a fermentação, a uma temperatura entre 11 e 12°C, durante três meses. No final da fermentação, conservam-se os vinhos em contacto com os sedimentos de leveduras que se vão acumulando. A parede celular das leveduras é composta por beta-glucanas e manoproteínas, sendo libertadas para o vinho em contacto com as borras (leveduras) pois as leveduras entram em processo de autólise enzimática por beta-glucanases presentes nas paredes celulares. Nos vinhos brancos, estes polissacarídeos libertados pelo envelhecimento com as leveduras, são capazes de combinar com compostos fenólicos, diminuindo assim a cor amarela do vinho, e alguns compostos voláteis.(9) As manoproteínas têm um papel essencial nas propriedades organoléticas e na estabilidade do vinho, já que também previnem a precipitação dos sais tartáricos, afetando o rácio do crescimento dos cristais, bloqueando a sua formação. (10)

Após a fermentação em garrafa, dá-se o processo de remuagem, em que tradicionalmente as garrafas eram colocadas em "pupitres" onde eram rodadas para

progressivamente ficarem na posição vertical invertida, para que o depósito de leveduras ficasse no gargalo da garrafa, num processo que poderia demorar um mês. Atualmente existem outras opções que encurtam drasticamente a duração deste processo, como a adição de adjuvantes de sedimentação, centrifugação e a utilização leveduras imobilizadas em detrimento das leveduras livres. (11)

O *dégorgement* consiste em congelar o gargalo da garrafa por imersão deste num líquido que se encontra a uma temperatura de -20°C e na remoção da cápsula que, devido à pressão interna da garrafa, conduz à expulsão do bloco de gelo do topo do gargalo, que contém os sedimentos da levedura formados durante a fermentação. Após o *dégorgement* a garrafa de espumante perdeu algum volume de vinho que é necessário repor. Embora haja casos em que o atesto é feito apenas com o próprio vinho proveniente de outras garrafas, geralmente é utilizado um licor de expedição que, além do vinho contém açúcar numa dose que permite produzir os diferentes tipos de espumantes: "Extra-Bruto", "Bruto", "Meio-Seco", "Doce". (12) O licor pode conter anidrido sulfuroso e ácido ascórbico como conservante do vinho já que há risco da formação de odores indesejáveis e risco de desenvolvimento microbiano durante o armazenamento. Estes odores são devido à formação de grupos tióis (metanotióis, e dimeltisulfitos) por fotodegradação e aminoácidos enxofrados. (13) A rolha de cortiça definitiva é colocada e o vinho espumante pode ser comercializado.

1.2.2.1. Problemas na segunda fermentação na produção de vinho espumante

Um dos objetivos durante a maioria dos processos de produção de vinho é a realização de uma fermentação alcoólica completa, de modo que o açúcar residual no vinho seja inferior a 2 g/L. No entanto quando as leveduras são adicionadas para a segunda fermentação em garrafa, típica do método Champanhês, o início ou o decorrer da mesma é por vezes complicada. Na segunda fermentação em garrafa há uma moderação na acidez do vinho e um aumento do teor alcoólico, devido à formação de etanol. A segunda fermentação confere assim cerca de 1,5% de álcool a mais que o teor existente no vinho base. (14)

Para esta etapa do processo, frequentemente utilizam-se as leveduras imobilizadas em compostos orgânicos poliméricos, como polissacarídeos que são encontrados na natureza como constituintes das paredes celulares de plantas e algas, crustáceos ou insetos. Os

Introdução

polissacarídeos mais comuns são os alginatos, celulosos, carragenina, agar, ácido pécico e quitosano. Os alginatos estão presentes nas paredes celulares de algas, e são constituídos por unidades de ácido manurónico e gulurónico. (15)

As leveduras imobilizadas em esferas de alginato são usualmente usadas para o processo de segunda fermentação em garrafa, na produção de vinho espumante, facilitando a clarificação e a remoção das leveduras no final do processo. (6) Estudos com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas num gel de alginato-cálcio foram realizados no tratamento das fermentações lentas. As células obtiveram um melhor desempenho que o método tradicional que usa as células livres, demonstrando uma atividade fermentativa melhorada, e sem aumento de acidez volátil ou desenvolvimento de odores estranhos. (16,17)

As vantagens do uso das leveduras imobilizadas em detrimento das leveduras livres incluem uma atividade e estabilidade prolongada da biocatálise já que a imobilização protege as leveduras contra efeitos de pH, (18) temperatura, solventes ou mesmo metais pesados; tempos de fermentação mais curtos e maior densidade de células; rendimentos mais elevados já que há um aumento no *uptake* do substrato devido a um aumento da atividade de enzimas como a hexocinase e a fosfofructocinase; (17,19) tolerância aumentada a altas concentrações de substrato; recuperação facilitada do produto resultando numa redução de custos do equipamento e energéticos, e redução do risco de contaminação microbiana devido à elevada densidade de células e atividade fermentativa. (15)

No entanto, o elevado teor de açúcar inicial, deficiências nutricionais ao nível de azoto e vitaminas, condições anaeróbicas, elevado teor de etanol, o excesso de clarificação do mosto e de concentrações elevadas de acidez volátil, representam fatores de risco para a ação fermentativa das leveduras imobilizadas. (20)

Por exemplo, elevados níveis elevados de açúcar expõem a levedura a condições hipertónicas, logo que são inoculadas, levando a uma efluxo de água a partir da célula, causando a rutura da célula. Já a deficiência em azoto pode levar à inativação do sistema de transporte de hexoses e o etanol produzido durante a primeira fermentação, acumula-se tornando-se tóxico para o final da fermentação. (20) Assim, as leveduras adicionadas para a realização da fermentação em garrafa, poderão encontrar um meio com falta de nutrientes essenciais, tanto ao nível de azoto e oxigénio, como a nível mineral, fruto do consumo pelas

leveduras na fermentação anterior e também pelos processos físico-químicos efetuados ao vinho. (21)

1.2.2.2. Os metais no metabolismo da levedura

As leveduras requerem uma vasta gama de metais para o seu crescimento e funções metabólicas. Desta forma, a biodisponibilidade dos metais é essencial no meio industrial pois influencia drasticamente a performance da levedura levando a fermentações interrompidas caso haja carência. A Tabela 2 enumera os metais e as concentrações necessárias para o crescimento celular e reprodução da *S. cerevisiae*. (22,23)

Tabela 2 - Metais essenciais para o crescimento e funções metabólicas das leveduras *S. cerevisiae*.

Ião metálico	Concentração no meio de cultura para crescimento das <i>S. cerevisiae</i> .	Principais funções celulares
K	78-156 mg/L	Osmorregulação, atividade enzimática
Mg	48-96 mg/L	Atividade enzimática, divisão celular
Mn	110-220 µg/L	Cofator enzimático
Ca	Vestigial (< 1 µg/L)	Mensageiro secundário, floculação das leveduras
Cu	96 µg/L	Pigmentos redox
Fe	56-168 µg/L	Proteínas-heme, citocromos
Zn	262-523 µg/L	Atividade enzimática, estrutura de proteínas
Mo	63,9 µg/L	Metabolismo do nitrato, vitamina B12
Co	5,9 µg/L	Cobalamina, coenzimas

[Adaptado de Walker (23)]

Potássio, magnésio, cálcio e zinco são nutrientes catiónicos que desempenham papéis estruturais e funcionais essenciais para as células das leveduras.

Introdução

O potássio (78-156 mg/L) é o catião celular mais abundante nas leveduras, constituindo 1-2% de extrato seco das leveduras, e é o principal eletrólito para a osmorregulação, regulação do fosfato, síntese proteica e ativação enzimática. O potássio age também como um cofator para enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa e catabolismo de hidratos de carbono. (24)

Devido às funções desempenhadas pelo K^+ na célula, a diminuição do teor celular deste catião tem efeitos deletérios. O primeiro efeito da deficiência de K^+ , que pode ocorrer quando a concentração externa de K^+ é demasiado baixa para permitir uma absorção suficiente de outros catiões alcalinos, é a substituição de uma quantidade de K^+ por H^+ , para manter a neutralidade elétrica da célula. Além deste decréscimo de K^+ afetar as funções osmóticas, esta substituição diminui o pH interno celular o que inibe diretamente a síntese proteica. (25)

O magnésio (48-96 mg/L) é essencial para o crescimento da levedura já que na sua ausência, as células não completam mitose. Constitui cerca de 0,3% do extrato seco da levedura e é um cofator essencial para várias enzimas envolvidas em vias metabólicas e bioenergéticas (síntese de ADN e ATP). Ele está envolvido na integridade celular, geralmente estabilizando ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lípidos. Também está envolvido no controlo metabólico, e na proliferação e crescimento celular. (20) O Mg^{2+} é indispensável para a via glicolítica já que é um cofator para a enzima hexocinase, que transfere um grupo fosfato de uma molécula de ATP para uma de glucose, fosforilando-a em C-6. É essencial também para outra enzima, a fosfohexose isomerase, que catalisa uma reação reversível de isomerização entre a glucose 6-fosfato e a frutose 6-fosfato; e para a fosfofrutocinase 1 (PFK-1) que catalisa a transferência de um grupo fosforil do ATP para a frutose 6-fosfato, originando frutose 1,6-bifosfato. Também é cofator da fosfoglicerato cinase, que transfere um grupo fosforil da 1,3- bisfosfoglicerato para uma molécula de ADP, dando origem a ATP e 3- fosfoglicerato que é depois convertido em piruvato. Na formação de etanol, a última enzima dependente de Mg^{2+} é a piruvato descarboxilase (Figura 2).

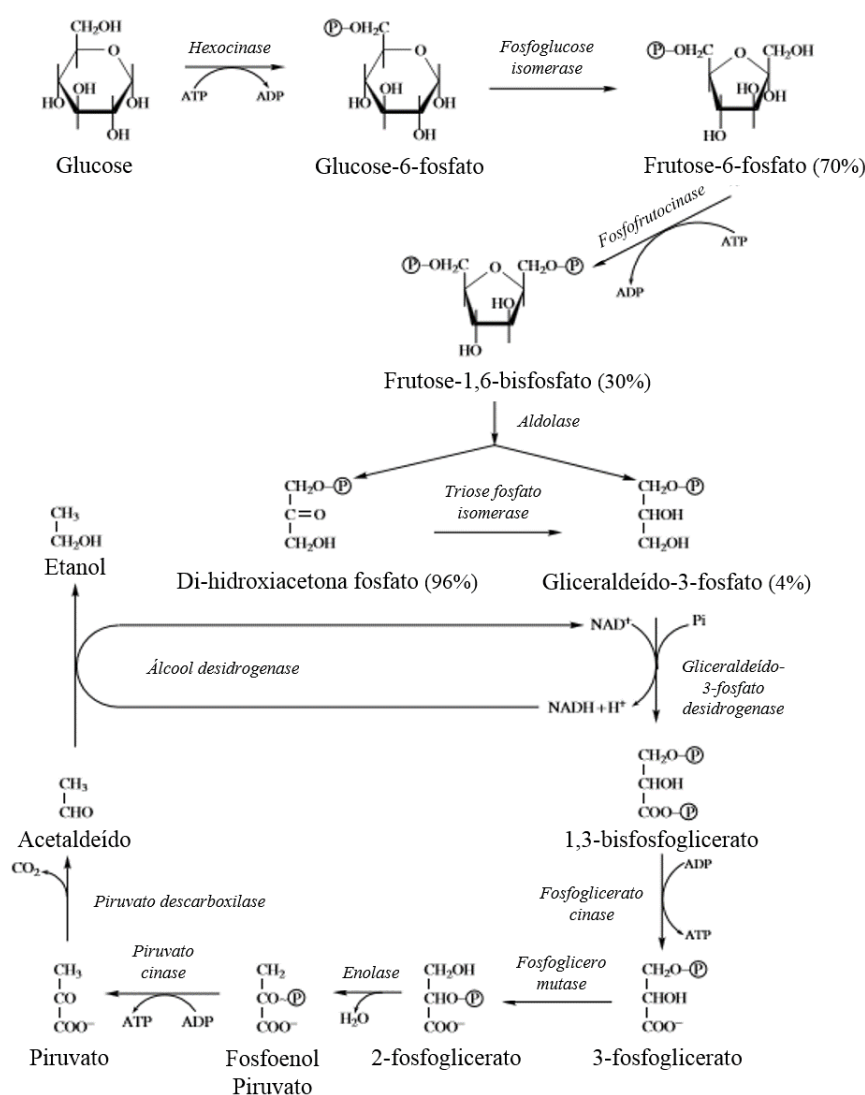


Figura 2 - Via da glicólise e da fermentação alcoólica.

Em fermentações industriais, isto significa que se o meio se encontra limitado em Mg^{2+} , a conversão de açúcar em álcool pode ser suprimida levando a processos de fermentação incompletos ou lentos. Há assim uma relação direta entre a disponibilidade de Mg^{2+} e a cinética de fermentação, sendo esta afetada pela carência deste metal.

O cálcio (vestigial ($< 1 \mu\text{g/L}$)) pode agir como um protetor de certas proteínas (como enzimas hidrolíticas) e como um ajudante na interação entre leveduras durante o processo de floculação e aglomeração. A presença de cálcio em concentrações ótimas (2,5 a 10 mM) foi também associada ao aumento da termoestabilidade das leveduras. (26) Etanol e altas temperaturas interferem com a organização da membrana, aumentando a sua fluidez e a permeabilidade a iões e pequenos metabolitos, e inibem o transporte de nutrientes. (26)

Introdução

Assim, o aumento na termoestabilidade pela presença de concentrações ótimas de Ca^{2+} está relacionado, assim, com um aumento da tolerância ao etanol na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*. Este efeito positivo é esperado que seja mais significativo em fermentações com elevado teor de etanol, como é o caso da segunda fermentação em garrafa para a produção de espumantes.

O zinco (262-523 $\mu\text{g/L}$) é também essencial para o crescimento da levedura assumindo várias funções no seu metabolismo (Tabela 3). O Zn^{2+} é um cofator catalítico essencial de muitas enzimas, sendo que a análise do genoma da *S. cerevisiae* indica que quase 3% das proteínas da levedura contêm domínios ligantes a zinco. (27) Essas proteínas incluem a fosfatase alcalina, a anidrase carbônica e várias carboxipeptidases e a álcool desidrogenase (Figura 3). O zinco estimula a ligação do acetaldeído à enzima álcool desidrogenase, promovendo a sua redução a etanol e aumentando assim o rendimento alcoólico da fermentação. (28)

Tabela 3 - Funções do zinco na fisiologia da levedura.

Função	Exemplos
Atividade enzimática	Desidrogenases (álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, cisteína dessulfidrase, anidrase carbônica, carboxipeptidase A e B, fosfatase alcalina, aldolase, superóxido dismutase, DNA/ RNA polimerase, ribonuclease
Manutenção da estrutura proteica	Proteínas de ligação a DNA
Integridade da superfície celular	Promove floculação das leveduras, estabiliza membranas celulares
Captação de açúcares	Estímulo de captação de maltose e maltotriose
Outros	Ativação da síntese de riboflavina

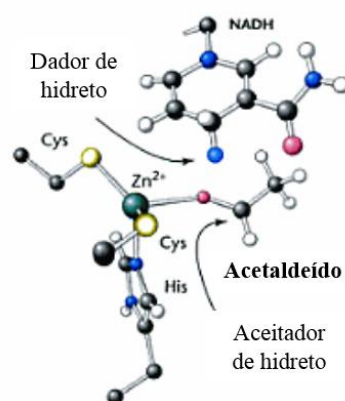


Figura 3 - Centro ativo da enzima álcool desidrogenase. O centro ativo contém um íon zinco unido a dois resíduos de cisteína e a um resíduo de histidina.

A presença de íons de Zn^{2+} em quantidades adequadas (262-523 $\mu\text{g/L}$) aumenta a taxa de crescimento de células de levedura, bem como a produção de etanol. Em contraste, a deficiência de íons Zn^{2+} inibe o crescimento de células e a atividade de fermentação. (28)

O cobre e ferro têm um papel fundamental nas vias energéticas. O metabolismo do piruvato, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, contêm inúmeras enzimas dependentes de Cu^+ e Fe^{2+} sendo estas vias muito suscetíveis a variações destes metais. No ciclo de Krebs, a aconitase e a succinato desidrogenase requerem grupos prostéticos de ferro-enxofre ou heme como cofatores. (28) Cobre (96 $\mu\text{g/L}$) e ferro (56-168 $\mu\text{g/L}$) são cofatores das enzimas envolvidas em reações de oxidação-redução devido à sua capacidade de perda ou ganho de elétrons. Assim, eles são encontrados nas mitocôndrias onde participam na fosforilação oxidativa e são componentes essenciais da cadeia respiratória. Enquanto o ferro é abundante na mitocôndria, em complexos Fe-S e citocromos, o cobre é um cofator da citocromo oxidase, no último passo da cadeia respiratória. (29)

Manganês (110-220 $\mu\text{g/L}$) é um elemento vestigial essencial, requerido para o crescimento da levedura, a uma concentração externa de aproximadamente três ordens de grandeza inferiores à da concentração de magnésio. Este é um competidor intracelular do Mg^{2+} ao ligar-se a enzimas dependentes de Mg^{2+} , ATP e ácidos nucleicos. No entanto há enzimas que requerem especificamente Mn^{2+} , que não pode ser substituído por Mg^{2+} . Na levedura, o Mn^{2+} é também um cofator para a enzima mitocondrial superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, protegendo as células da toxicidade do oxigênio. (30)

Outros elementos vestigiais, cobalto e molibdênio, são requeridos para metaloenzimas, pigmentos *redox* e vitaminas como estabilizadores estruturais e cofatores.

As leveduras requerem a presença de certos metais para a realização de uma fermentação alcoólica completa, essencial para a obtenção de um espumante com pressão de CO₂. No entanto, os processos físico-químicos efetuados ao longo do vinho para a estabilização do mesmo podem ter influência na composição mineral do vinho base, afetando o desempenho das leveduras na segunda fermentação em garrafa. Um exemplo de um processo efetuado no vinho, que altera a sua composição mineral, é a eletrodialise. Este tratamento é efetuado de modo a obter um vinho sem precipitações, normalmente formados devido à presença de ácidos orgânicos provenientes das uvas.

2. Ácidos orgânicos no vinho

Os ácidos orgânicos do vinho são de enorme importância para o seu perfil sensorial. Os ácidos mais abundantes são o ácido tartárico, o ácido málico, o ácido cítrico, o ácido láctico e o ácido succínico (Figura 4). Os ácidos tartárico e málico provêm das uvas. Este último converte-se em láctico no decurso da fermentação malolática que por vezes decorre no processo de maturação dos vinhos. (31)

É normalmente o ácido tartárico, que precipita, originando os cristais que interferem no aspeto visual do vinho.

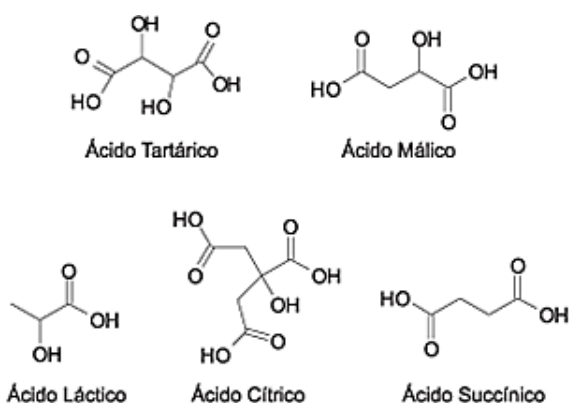


Figura 4 - Estruturas químicas dos ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico.

2.1. O Ácido Tartárico

O ácido tartárico é um ácido não volátil que se encontra no mosto em concentrações relativamente elevadas, cerca de 2 e 6 g/L (6) podendo variar conforme a região, casta, tipos de solo e práticas culturais. Este ácido forma sais insolúveis e precipita essencialmente sobre a forma de hidrogeno tartarato de potássio (HTK) (Figura 5) ou tartarato de cálcio (CaT). (6)

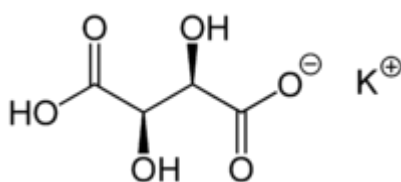


Figura 5 - Hidrogeno tartarato de potássio.

Durante a transformação do mosto em vinho produz-se etanol, o que diminui a solubilidade do HTK, o principal sal do ácido tartárico presente no meio. Assim, o vinho encontra-se sobressaturado em HTK, o que origina a precipitação deste sal. (32)

A Figura 6 mostra a distribuição de espécies de tartarato no vinho em função do pH. (33)

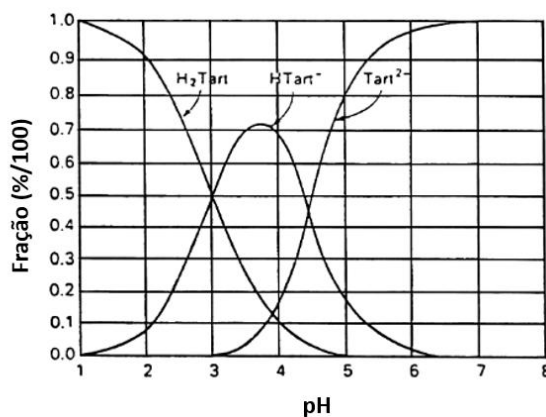


Figura 6 - Distribuição de espécies de tartarato no vinho em função do pH [Adaptado de Zoecklein B. (4)].

A percentagem de hidrogeno tartarato presente na forma de hidrogeno tartarato de potássio é máxima a pH 3.7, logo, a precipitação será maior nesse ponto. Assim, qualquer

tratamento efetuado ao vinho que origine uma alteração de pH, tal como a fermentação malolática, pode afetar a precipitação do hidrogeno tartarato. (34)

A cristalização do hidrogeno tartarato de potássio ocorre em três etapas: (i) sobressaturação; (ii) formação de núcleos; (iii) crescimento dos cristais por difusão e depois integração à superfície. (35)

O nível relativo de saturação em HTK é determinado pela medição do rácio, S , entre o produto da concentração (PC) e o produto da solubilidade de HTK: (33)

$$S = PC / K_{sp}$$

Onde PC é o produto da concentração do ião potássio e a concentração do ião hidrogeno tartarato no vinho. K_{sp} refere-se à solubilidade do sal HTK numa mistura hidroalcoólica saturada neste sal, com um teor alcoólico idêntico ao vinho. Se S é positivo, o vinho encontra-se saturado com HTK. Se $S > 3$, há condições para cristalização espontânea. (33)

A cristalização de uma solução ocorre quando a concentração do soluto num solvente excede a sua solubilidade. No entanto, para um sistema iniciar a cristalização tem que primeiro ocorrer a nucleação. (36) A nucleação pode ocorrer através de dois mecanismos (Figura 7). A nucleação primária ocorre numa solução hipersaturada e envolve longos tempos de indução. Contrariamente, a nucleação secundária ocorre quando cristais de um soluto homogéneo são introduzidos para aumentar o grau de sobressaturação do soluto na solução. A adição destes cristais elimina o tempo de indução requerido para a nucleação primária. (36)

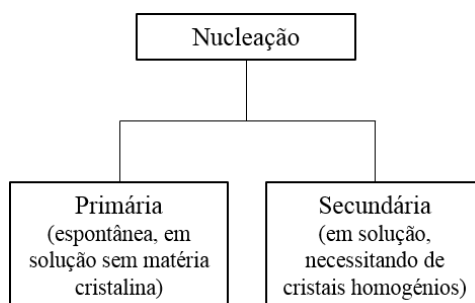


Figura 7 - Tipos de nucleação [Adaptado de Lasanta (33)].

Depois do núcleo estar formado na solução sobressaturada, este começa a evoluir para cristais visíveis. O mecanismo para o crescimento do cristal envolve duas etapas, uma de difusão seguida por uma fase de integração na superfície. (33)

A etapa de difusão ocorre quando as espécies de soluto são transportadas por difusão e/ou convecção da solução para a superfície do cristal. Na segunda fase do processo, estas espécies iônicas migram para a superfície do cristal e são integradas na matriz cristalina. (36)

2.1.1. Fatores que influenciam a cristalização do hidrogeno tartarato de potássio

O fenómeno de cristalização depende de vários fatores, tais como: (i) temperatura, já que temperaturas mais baixas favorecem o processo; (ii) teor alcoólico, cujo aumento durante a fermentação diminui a solubilidade e origina uma solução supersaturada em HTK; (iii) agitação, que acelera a formação de cristais, usada para induzir a cristalização por favorecimento do processo de nucleação; (iv) presença de metais no meio, tais como o magnésio e o cálcio, podem formar complexos com o ácido tartárico livre e os iões de potássio afetando assim, a formação e precipitação de HTK; (v) o pH, (vi) impurezas e aditivos que afetam a cinética de cristalização por interferência com o arranjo cristalino, e por último, (vii) presença de polissacarídeos e polifenóis, já que solubilidade do HTK aumenta nos vinhos quando comparada com modelos de soluções de etanol, dado que as espécies do soluto, K^+ e HT^- , podem formar complexos com outras moléculas ficando indisponíveis para cristalização. (28,30) A estabilidade tartárica deve ser controlada após todos os tratamentos efetuados ao vinho e antes do momento de engarrafamento.

O tartarato neutro de cálcio (Figura 8) é um sal insolúvel, cerca de dez vezes menos solúvel que o hidrogeno tartarato de potássio. (6)

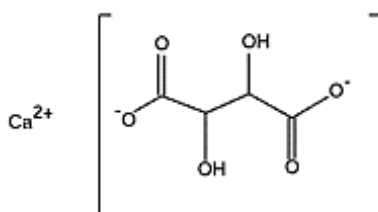


Figura 8 - Tartarato neutro de cálcio.

Apesar da cristalização do tartarato de cálcio ser semelhante à do hidrogeno tartarato de potássio, o tempo necessário para se dar a cristalização espontânea do tartarato de cálcio é muito superior, daí que instabilidade causada por este sal apareça apenas 4 a 7 meses após a fermentação. A estabilização de tartarato de cálcio é mais complexa já que a sua solubilidade não é tão afetada pela temperatura nem pelo aumento do teor alcoólico. O pH exerce a principal influência no grau de solubilidade do tartarato neutro de cálcio. A presença de ácido málico pode auxiliar na inibição da precipitação destes cristais, e portanto, a fermentação malolática tem um papel fundamental na estabilidade do vinho em relação ao tartarato de cálcio, visto que com a diminuição da quantidade de ácido málico, mais facilmente se dão as precipitações dos cristais. (36)

A presença de cristais de hidrogeno tartarato de potássio não minimiza o tempo de cristalização do tartarato neutro de cálcio, visto que os seus núcleos não têm influência na fase de nucleação dos cristais de tartarato de cálcio. Os problemas com o tartarato neutro de cálcio surgem, normalmente, por uso excessivo de carbonato de cálcio na desacidificação do vinho ou de bentonite cálcica para tratamentos de mosto e vinho. (6)

3. Estabilização tartárica

Devido à exigência dos consumidores foi necessário, que se encontrassem técnicas para apresentar no mercado um vinho límpido e sem precipitações de hidrogeno tartaratos de potássio e de tartarato neutro de cálcio. Há diversos métodos usados para a estabilização tartárica de vinhos, como: (i) troca iónica; (ii) ácido metatartárico; (iii) manoproteínas; (iv) carboximetilceluloses; (v) estabilização por frio; (vi) eletrodialise. (37)

3.1. Troca iónica

A troca iónica é baseada em resinas com uma matriz polimérica e grupos funcionais ionizados covalentemente ligados e eletricamente neutralizados por iões móveis. Existem resinas catiónicas, que trocam catiões, tendo sulfonatos como grupos funcionais $-SO_3^-$ ou carboxílicos $-COO^-$. Já as resinas aniónicas, que trocam aniões, possuem grupos $-NR^{3+}$, $-NR^{2+}$ ou $-NH_2R^+$. (37,38) Assim, a estabilização tartárica do vinho por troca iónica pode ser efetuada de três formas distintas: (i) uso de uma resina de troca catiónica, onde os iões potássio do vinho são substituídos por protões da resina, (ii) uso de uma resina de troca

aniónica na forma hidroxilo (OH^-), onde o ião OH^- é substituído pelo ião tartarato (HT^-), (iii) uso de um tratamento misto onde o potássio e o tartarato são trocados por H^+ e OH^- , respetivamente, com duas resinas (uma catiónica e outra aniónica), com o objetivo da troca de algum hidrogeno tartarato por água. (39) O primeiro método, troca catiónica, é o único autorizado pela União Europeia já que o tratamento do vinho pelos outros dois métodos pode causar alterações significativas nas características analíticas e organolépticas dos vinhos. Contudo este tipo de tratamento resulta numa drástica descida do pH. Tipicamente, a operação envolve a mistura de uma certa quantidade de vinho tratado pelas resinas com o resto do vinho não tratado. Nos vinhos brancos, a proporção de mistura varia entre 10% e 20% de vinho tratado. (39)

3.2. Ácido metatartárico

A estabilização tartárica também pode ser conseguida pela adição de substâncias que previnem a precipitação dos cristais, tanto pela inibição da sua formação como pela modificação das suas propriedades tornando-os solúveis a baixas temperaturas. O ácido metatartárico (MTA), um produto resultante de uma esterificação parcial do ácido tartárico, previne o crescimento dos núcleos microscópicos dos cristais. O mecanismo de inibição aparenta ser a interferência na formação e crescimento dos cristais de hidrogeno tartarato. A principal desvantagem desta método, é a baixa estabilidade do MTA no vinho, já que este ácido vai sendo lentamente hidrolisado a ácido tartárico, com a correspondente perda do seu papel protetor e aumento da instabilidade tartárica. (40) O seu período de ação é assim função da temperatura de armazenamento do vinho tratado, sendo o uso do MTA adequado em vinhos consumidos num curto período de tempo. (37)

3.3. Manoproteínas

As manoproteínas (MP) são glicoproteínas constituintes das paredes celulares de *S. cerevisiae* que podem ser naturalmente encontradas no vinho devido ao processo de autólise após a fermentação, mas também podem ser adicionadas diretamente ao vinho como uma preparação comercial. (41) Vários estudos mostram que as MP evitam a precipitação do HTK pela inibição da sua cristalização. As MP afetam o rácio de crescimento do cristal por

ligação a pontos de nucleação e prevenindo a expansão da estrutura cristalina. O efeito estabilizador das MP é superior comparativamente ao do ácido metatartárico e atrasa por um mês o aparecimento de cristais no que respeita a vinhos não tratados. Com uma dose de 25 g/hL de MP, vinhos brancos permanecem estáveis mesmo depois de terem estado seis dias a uma temperatura de -4°C. (42)

3.4. Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um derivado da celulose obtido por esterificação dos grupos OH primários das unidades de glucopiranoses ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. A CMC pode ser obtida com diferentes graus de substituição (DS-número de unidades de glucose substituídas em relação ao total de unidades de glucose) e diferentes graus de polimerização (DP), isto é, o número médio de unidades de glucose por cadeia. (41) Assim, quanto maior o DP, maior será o número de locais disponíveis para ligação a catiões, aumentando-se assim a eficácia da CMC. A CMC é um polímero aniónico que compete com outros iões presentes no vinho na ligação à superfície dos cristais o que atrasa o seu crescimento (nucleação), diminui o seu tamanho e conseqüentemente a precipitação em garrafa. As moléculas de CMC negativamente carregadas ao pH do vinho, interagem com a superfície eletropositiva dos cristais de hidrogeno tartarato, onde o potássio está acumulado, inibindo o seu crescimento. A CMC também pode atuar por complexação com o potássio, diminuindo a quantidade de iões livres envolvidos na formação de cristais. (41) Contudo a falta de estabilidade química da CMC em presença de etanol e a pH baixo, pode colocar graves problemas no que diz respeito à ruptura da ligação química entre os hidroxilos da celulose e os radicais metilo. Estes grupos podem libertar-se e ficar em solução no vinho, com graves riscos para a saúde humana. (40)

3.5. Estabilização por frio

A estabilização por frio é o método mais utilizado na estabilização tartárica. O vinho é arrefecido a uma temperatura próxima do seu ponto de congelamento e mantido a esta temperatura entre 3 dias e 3 semanas. O objetivo é a redução da solubilidade dos sais de tartarato, sendo que este tratamento não é tão efetivo para sais o CaT. A temperatura

necessária para existir precipitação do hidrogeno tartarato de potássio é calculada com base na fórmula (6):

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

No período em que o vinho está a baixas temperaturas há uma precipitação inicial rápida do tartarato de potássio que se vai tornando mais lenta, devido à redução do nível de saturação em hidrogeno tartarato de potássio. (34) As variações de temperatura durante o processo de estabilização lenta podem, também, influenciar a precipitação de cristais de hidrogeno tartarato de potássio, porque baixa a taxa de nucleação destes cristais. Este processo provoca o aparecimento de grandes cristais de hidrogeno tartarato de potássio, que são fáceis de remover por filtração a frio de forma a evitar a redissolução dos cristais. A refrigeração do vinho é geralmente efetuada num equipamento de arrefecimento com permutador de calor em contacto direto com a câmara de evaporação, que arrefece instantaneamente o vinho. (6)

Esta operação pode afetar a qualidade do vinho devido à precipitação simultânea de polissacarídeos e polifenóis juntamente com os cristais de HTK. O tratamento pelo frio também oxida muitos dos aromas do vinho, dado que potencia a incorporação de oxigénio no vinho já que os gases são mais solúveis nos líquidos frios do que à temperatura ambiente. Além disso, a estabilização por frio é um processo longo, com elevados custos energéticos e elevados custos no que diz respeito ao material necessário para implementar este sistema, já que é requerido um permutador de calor e cubas isotérmicas preparadas para refrigeração (36)

No entanto, esta técnica tem evoluído para uma “técnica de contacto” visto que se adicionam pequenas quantidades de sais de hidrogeno tartarato de potássio com agitação. A sua grande vantagem é a diminuição do tempo a que o vinho está sujeito a baixas temperaturas e também tem a vantagem que a temperatura a que tem de estar o vinho ser relativamente mais elevada do que no método da estabilização longa, visto que neste método o vinho pode estar a sensivelmente 0°C. Com a adição dos cristais de hidrogeno tartarato (4 g/L), há a eliminação da fase de nucleação, acelerando o processo de precipitação. Contudo esta técnica apresenta algumas limitações (35), já que desta forma há o aparecimento de cristais de tamanho mais pequeno, mais difíceis de eliminar. No final do processo, tal como

no processo de estabilização longa, é ainda necessária uma filtração para evitar a redissolução dos cristais. Sendo esta etapa, realizada à mesma temperatura do tratamento, existe o risco de oxidações resultante das temperaturas baixas usadas no processo. (6) Ainda devido aos elevados custos do processo, reutilizam-se os cristais de HTK. Porém, para se reutilizar estes cristais, é necessário, uma lavagem para remover contaminantes que fiquem incrustados na sua superfície. Esta lavagem pode trazer perdas de 3 a 6% de cristais. (28)

3.6. Eletrodiálise

A eletrodiálise (ED) é um processo físico que permite separar iões de moléculas neutras, por membranas de permeabilidade seletiva. Este processo poderia decorrer por difusão simples, como acontece na hemodiálise (diálise do sangue), mas que no caso do vinho não há qualquer inconveniente em ser acelerado por um campo elétrico. (20) Existem dois tipos de membranas: as catiónicas, que são permeáveis unicamente aos catiões (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) e as aniónicas que são permeáveis unicamente aos aniões (anião hidrogeno tartarato, HT^-). Esta propriedade é conseguida pela introdução de grupos químicos carregados que permanecem ligados à matriz polimérica (Figura 9).

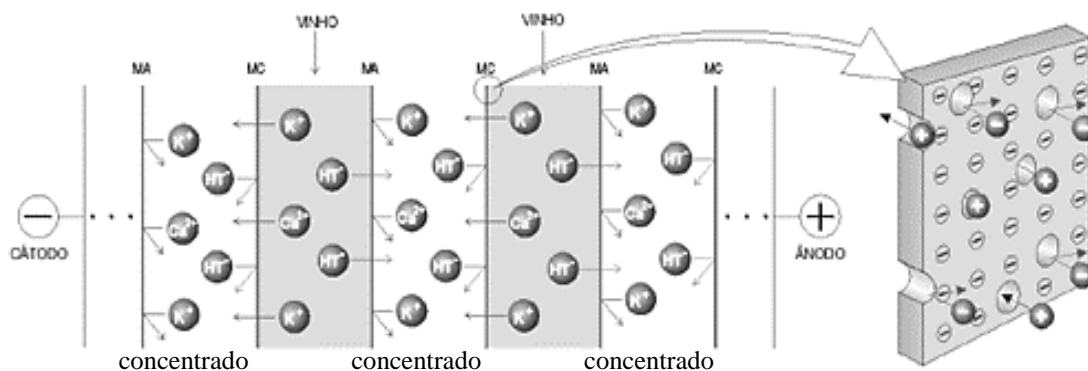


Figura 9 - Esquema de um empilhamento de eletrodiálise e detalhe de uma membrana catiónica. MA- membrana aniónica; MC- membrana catiónica; HT - anião hidrogeno tartarato [Adaptado de Cameira dos Santos (32)].

As membranas catiónicas são constituídas por polímeros de estireno divinilbenzeno com grupos funcionais de ácido sulfónico, enquanto as membranas aniónicas são formadas por polímeros de estireno divinilbenzeno com grupos quaternários de amónia ou por um

polímero de amónia quaternária e divinilbenzeno (International Oenological Codex, 2011). Num empilhamento (Figura 9) estes pares de membranas, são montados de forma a definir compartimentos, por onde passam, por um lado, uma solução aquosa (compartimento do concentrado) e por outro o vinho (compartimento do diluato), constituindo o conjunto dos dois compartimentos uma célula de eletrodialise.

Sob a influência de um campo elétrico (1 V/cm), uma parte dos catiões do vinho migra em direção ao cátodo, atravessando a membrana catiónica (MC) da célula de eletrodialise, sendo então mantidos no compartimento do concentrado, uma vez que não são capazes de atravessar a membrana aniónica (MA). Simultaneamente, uma parte dos aniões migra em direção ao ânodo, atravessando a membrana aniónica, ficando também retidos no compartimento do concentrado da mesma célula de eletrodialise (devido à existência da membrana catiónica).

A concentração dos iões vai aumentar num compartimento, o do concentrado, e diminuir no compartimento seguinte, designado compartimento do diluato. O catião K^+ é o que migra mais facilmente, enquanto o Na^+ e o Ca^{2+} são menos móveis e de mais difícil migração. Os iões como têm carga elétrica, põem-se em movimento no seio do campo elétrico, atravessam a membrana de eletrodialise, e do outro lado da membrana (compartimento do concentrado) são recolhidos por um fio de água que, passando a conter iões em solução, se passa a designar salmoura. Entre os aniões, o hidrogeno tartarato é o que tem maior facilidade em migrar. (6)

A remoção dos iões é conseguida, hidrogeno tartarato e do potássio em excesso, gradual e continuamente, à medida que o vinho, numa camada muito fina (0,3 a 2 mm), circula pelo empilhamento de membranas. Existem diferentes tipos de pares de membranas, com capacidade para eliminar diferentes tipos de iões, sendo assim, possível, melhorar a eliminação de HTK e de potássio escolhendo o par ideal de membranas, com uma influência mínima nas características do vinho. (6)

As membranas têm de respeitar certas exigências, tais como, o material que as constitui tem de estar aprovado para entrar em contacto com produtos alimentares, impedir a migração de compostos que possam modificar a qualidade do vinho ou ponham em perigo a saúde humana, a sua utilização não deve resultar na formação de novos compostos que inicialmente não estavam presentes no vinho, não devem libertar substâncias capazes de causar dano à saúde humana ou afetar a qualidade do vinho, as membranas devem ser

Introdução

conservadas e limpas utilizando-se substâncias autorizadas para uso alimentar e ainda têm de respeitar critérios como, redução máxima de teor alcoólico de 0,1% vol, redução de pH inferior a 0,25 unidades, e redução máxima de acidez volátil de 0,09 g/L (expressa em H₂SO₄, ou 0,14 g/L expressa em ácido tartárico (International Oenological Codex, 2011). (6,46)

Além disto, estas têm de apresentar uma resistência elétrica inferior a 10 Ω porque se a resistência elétrica das membranas for muito elevada, a corrente elétrica não flui facilmente, e é um obstáculo à transferência de massa. Uma resistência elétrica elevada iria aumentar a temperatura do empilhamento de membranas, podendo queimá-las. Neste caso, o empilhamento de membranas transformava-se num radiador elétrico de aquecimento. As membranas necessitam também de possuir resistência mecânica para suportar as diferenças de pressão e química para serem estáveis a pH baixos. (36)

O caudal de tratamento depende da temperatura, do grau de desionização, assim como do tipo de vinho, podendo o caudal de vinho a ser tratado chegar até 3000 L/h.

3.6.1. Vantagens da eletrodialise

Uma característica importante da eletrodialise é o facto de que durante a circulação do vinho, a área de contacto com a membrana é reduzida e não há infiltração de vinho através de meios porosos com extensas áreas de superfície que conduzem muitas vezes a fenómenos de adsorção de moléculas orgânicas fundamentais para as propriedades organoléticas dos vinhos. Assim esta técnica, não afeta a cor dos vinhos devido à retenção de compostos fenólicos. Efetivamente, as membranas de eletrodialise não têm poros (são designadas de membranas densas), e por isso os fenómenos de adsorção são diminutos. (39)

A eletrodialise assegura também um controlo preciso da concentração final de HTK, evita precipitação de polissacarídeos e polifenóis pois neste método não há precipitação de cristais de HTK que podem também conduzir à precipitação destes compostos, e reduz ainda fenómenos de oxidação do vinho. (30)

Outras vantagens da eletrodialise são os baixos requisitos energéticos, facilidade e rapidez de operação, não necessita aditivos, é efetuada à temperatura ambiente (minimizando os riscos de oxigenações), e permite a recuperação dos sais de tartarato. (35)

II. Objetivos

II. Objetivos

A eletrodialise é um processo usado no tratamento de vinhos, ideal para remover iões, tais como iões de potássio. O processo de eletrodialise origina uma diminuição do conteúdo em ácido tartárico, mas os polifenóis, polissacarídeos e aminoácidos não são afetados por este processo, assim como a matéria coloidal dos vinhos tintos. (6) Devido a estas vantagens, esta técnica tem vindo a ser cada vez mais utilizada por empresas vinícolas, como é o caso da Aliança- Vinhos de Portugal. Esta empresa fundada em 1927, e com sede em Sangalhos, Anadia, dedica-se à produção de vinhos, aguardentes e sobretudo espumantes, a imagem de marca da Aliança em Portugal. Devido à importância que a produção de espumantes de qualidade tem nesta empresa, tornou-se essencial estudar o impacto da eletrodialise no vinho base para durante processo de vinificação e espumantização.

Na eletrodialise pode ocorrer uma remoção de outros iões além do potássio e do hidrogénio tartarato. Esta remoção de iões pode afetar o decorrer da segunda fermentação alcoólica no processo de produção de espumantes. Assim, o primeiro objetivo do estudo é avaliar o efeito da eletrodialise na composição dos vinhos, principalmente o seu conteúdo em iões. Neste trabalho, foi acompanhado o processo de vinificação de dois vinhos brancos da casta Castelão. Um vinho foi produzido usando o processo normal de vinificação, sem adição de qualquer tipo de produto enológico, enquanto a outro vinho foi adicionado no início da fermentação alcoólica um produto enológico que consistia num concentrado de leveduras *S. cerevisiae* inativas. A adição deste produto enológico teve como objetivo a avaliação do efeito deste produto na composição e qualidade do vinho.

Para estudar o impacto da eletrodialise nos vinhos, foram analisados os parâmetros enológicos, análises realizadas na Aliança- Vinhos de Portugal, como a variação de acidez volátil, massa volúmica, extrato seco, acidez total, pH, dióxido de enxofre total e livre, turbidez e teor alcoólico. Foram também determinados os níveis de cations, tais como potássio, cálcio, sódio, ferro, cobre, zinco, manganês, molibdénio e cobalto, nos vinhos base.

Após a obtenção do vinho base, o segundo objetivo foi estudar o efeito nas propriedades do vinho espumante da adição, na segunda fermentação, de dois produtos enológicos. Estes produtos são compostos por leveduras inativas cuja função é potenciar a ação da levedura fermentativa, *S. cerevisiae*. Assim o objetivo da adição destes extratos foi

Objetivos

a avaliação do seu papel como suplemento no vinho espumante. Para isso, os níveis dos catiões foram determinados no vinho espumante com aditivos enológicos. Tanto os produtos enológicos como as leveduras foram fornecidos pela Proenol, uma indústria biotecnológica que produz e comercializa produtos para a indústria vinícola.

No final, os vinhos com estes aditivos enológicos foram analisados a nível sensorial para saber qual a sua potencialidade para serem comercializados. Parâmetros como gosto, aroma, cor e espuma foram avaliados em todos os vinhos espumantes produzidos.

III. Materiais e métodos

III. Materiais e métodos

1. Produção de vinho espumante

Todos os vinhos utilizados neste trabalho experimental foram obtidos a partir de uvas provenientes da Quinta dos Loridos, Bombarral, zona vitivinícola da região da Estremadura. As uvas utilizadas eram da casta Periquita (ou Castelão). As uvas foram recebidas a 2 de Setembro de 2014, com valores de 19 °Brix, 19 g/L ácido tartárico e pH 3.00, e para a produção do vinho base foram utilizados aproximadamente 15.000 Kg.

As uvas foram desengaçadas e prensadas mecanicamente, obtendo-se o mosto de primeira prensagem, o *cuveé*. No mosto adicionaram-se 40 mg/L de SO₂ e após arrefecimento para uma temperatura inferior a 20°C, foi-lhe adicionado 20 g/hL de polivinilpirrolidona (PVPP), usado para evitar o acastanhamento dos vinhos brancos. Seguidamente, adicionou-se carvão descorante ativado na dose de 1,5 g/L, utilizado para a descoloração de mostos e vinhos brancos por eliminação dos compostos fenólicos oxidados responsáveis pelo acastanhamento, e enzimas de clarificação, Novocclair® Speed, na dose de 1 g/L, que contêm pectinases que contribuem para a redução da viscosidade do mosto. O pH do mosto foi acertado para 3,20 pela adição de ácido tartárico.

O mosto resultante foi decantado e transferido para uma cuba de 30.000 L ao que se seguiu, um processo de defecação ou filtração. Seguidamente, adicionou-se 20 g/hL fosfato de diamónio (Fermaid O®) para suprir necessidades de azoto e fosfato das leveduras durante a fermentação alcoólica. Por último, transferiu-se o mosto já filtrado para cubas de 10.000 L.

As leveduras de *S. cerevisiae* (Affinity® ECA5), na dose de 20 g/hL, foram adicionadas aos mostos, tendo sido feitos 2 tratamentos diferentes: 1) 10.000 L de mosto foram inoculados apenas com a levedura, e 2) 10.000 L de mosto foram inoculados com a levedura e foi também adicionado um produto enológico, Optimum White® (OPMW), na dose de 30 g/hL. A ficha técnica que acompanha o Optimum White® designa-o como “*uma levedura enológica específica, inativada, rica em glutatião e polissacarídeos*”. Afirma ainda que o produto “*fornece proteção contra a oxidação e em termos de qualidade aromática do vinho, melhora a preservação de tióis e ésteres após um ano de envelhecimento em garrafa*”.

Materiais e métodos

A fermentação decorreu a 16°C, a densidade do mostos e a temperatura foram controladas diariamente de forma a monitorizar a fermentação alcoólica. Quando as densidades se encontravam em 1.060 g/L, efetuou-se a adição de um nutriente, o Fermaid E[®], a ambos os vinhos, na dose de 30 g/hL, sendo este produto usado para compensar deficiências nutricionais (azoto e aminoácidos) e fatores de crescimento (esteróis, ácidos gordos de cadeia longa). Aplicou-se também REDULESS[®], um derivado de levedura que diminui a concentração de compostos enxofrados, na dose de 1 g/hL.

As fermentações alcoólicas foram consideradas finalizadas para uma densidade inferior a 1,0 g/mL, mantendo-se constante durante 3 dias. Os mostos passaram a ser denominado de vinhos. Nesta etapa do processo houve a adição de SO₂ na dose de 15 mg/L e os vinhos ficaram em repouso 3 meses até se realizar uma filtração tangencial, seguida do processo de eletrodialise.

Para a realização da eletrodialise, foi utilizado um aparelho da marca Eurodia Industrie, S.A., modelo SV10, e que contém um empilhamento clássico com cerca de 150 células e membranas com área efetiva de 15m², que trabalham a uma voltagem máxima de 1,5 volts/célula. A sua capacidade máxima de estabilização de vinho é de 30 hL/h, e o caudal depende diretamente da quantidade de iões que deverá ser extraída do vinho (Figura 12).

Antes de se efetuar a eletrodialise é necessário conhecer a taxa de tratamento a que devem ser tratados os dois vinhos em estudo. Para isso, estas taxas de desionização foram obtidas previamente com um teste D.I.T. (*Degrée d'Instabilité Tartrique*), um teste de condutividade. Foram tratados os 10.000 L de cada uma das duas variedades de vinho, tendo sido retiradas amostras antes do processo de eletrodialise, e no final do tratamento do vinho.



Figura 10- Instalação de eletrodialise.

Verificando-se que os vinhos cumpriam os seguintes parâmetros:

- SO_2 livre < 15 mg/L
- $\text{pH} \geq 3,0$
- Teor alcoólico $\leq 11,5\%$ (v/v)
- Azoto assimilável ≥ 100 mg/L
- Estabilidade proteica e tartárica

obtiveram-se os vinhos base para o processo de espumantização. O primeiro, fermentado unicamente pela levedura, sem adição do produto enológico OPMW, denominou-se vinho Affinity; e o segundo vinho, que sofreu a adição do produto enológico, denominou-se vinho Affinity+OPMW.

Após a obtenção destes dois vinhos base, cada vinho foi utilizado para realizar 3 ensaios diferentes, tal como representado na Figura 10:

1. A 40 L de vinho não foi adicionado nenhum produto enológico (controlo)
2. A 40 L foram adicionados 10 g/hL de OptimumWhite®
3. A 40 L foram adicionados 10 g/hL de OptiRED®.

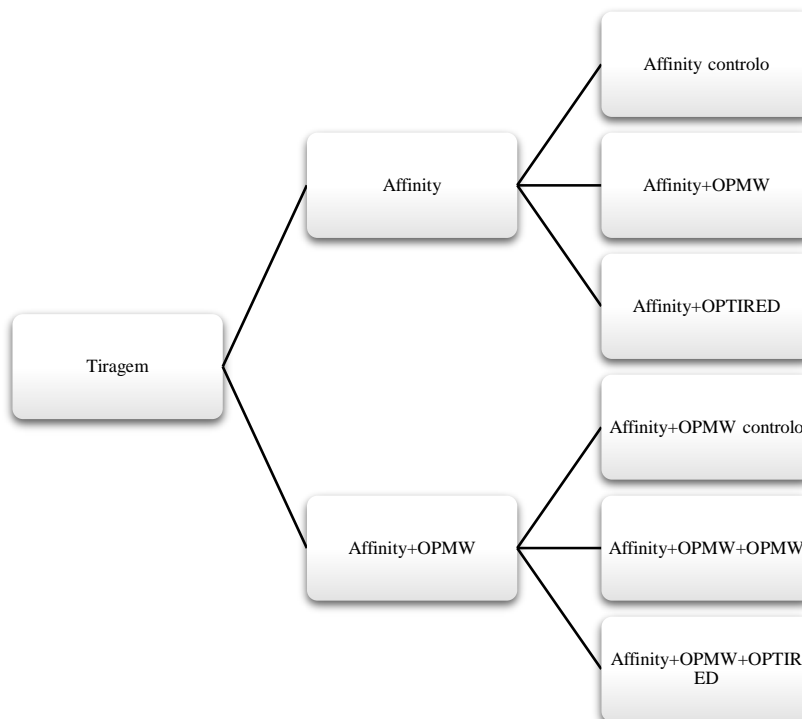


Figura 11 - Esquema dos ensaios realizados na tiragem para a obtenção do vinho espumante.

A ficha técnica que acompanha o OptiRED®, define-o como “*uma levedura enológica específica inativa, que aumenta a quantidade de polissacáridos aptos a combinar os taninos reativos, aumentando assim a redondez do mosto/vinho*”. Explica ainda que “*quando em concentração elevada os taninos polimerizam e/ou ligam-se a proteínas, formando moléculas de elevado peso molecular que tendem a precipitar*”. Assim, “*a existência de polissacarídeos evita esta situação já que evitam a sua reação com outras moléculas de taninos de elevado peso molecular, e, conseqüentemente, a sua precipitação*”. Assim, com a adição deste produto rico em polissacarídeos, os polifenóis adquirem uma estabilidade acrescida ao longo do envelhecimento mantendo a cor e as propriedades do vinho.

Após 24 h da adição dos produtos enológicos para estes ensaios, adicionou-se o licor de tiragem composto por açúcar (26 g/L), fosfato de diamónio (0,2 g/L) e tiamina (0,3 mg/L). Após 24 h, filtrou-se novamente o vinho por um sistema de filtros de 1,0 µm e 0,45 µm e procedeu-se ao seu engarrafamento. Como na produção de espumantes através do Método Clássico é realizada uma segunda fermentação alcoólica em garrafa optou-se pela utilização de leveduras imobilizadas em esferas de alginato, as ProElif®. Assim, as garrafas

previamente preparadas continham uma dose de esferas de 1,2 a 1,3 g/garrafa, o equivalente a 4,8 a 6 milhões de células viáveis por 1 mL de vinho.

Após o engarrafamento dos vinhos, estes permaneceram em repouso, sob temperaturas de 13-14°C. Colocaram-se manómetros nas variedades de vinho Affinity controlo e Affinity+OPMW controlo, na tiragem e a pressão de formação de CO₂ foi registada de 2 em 2 dias. Quanto às outras variedades, as análises à pressão (P_{CO₂}) foram efetuadas de quinze em quinze dias.

O esquema do processo de vinificação é apresentado na Figura 11.

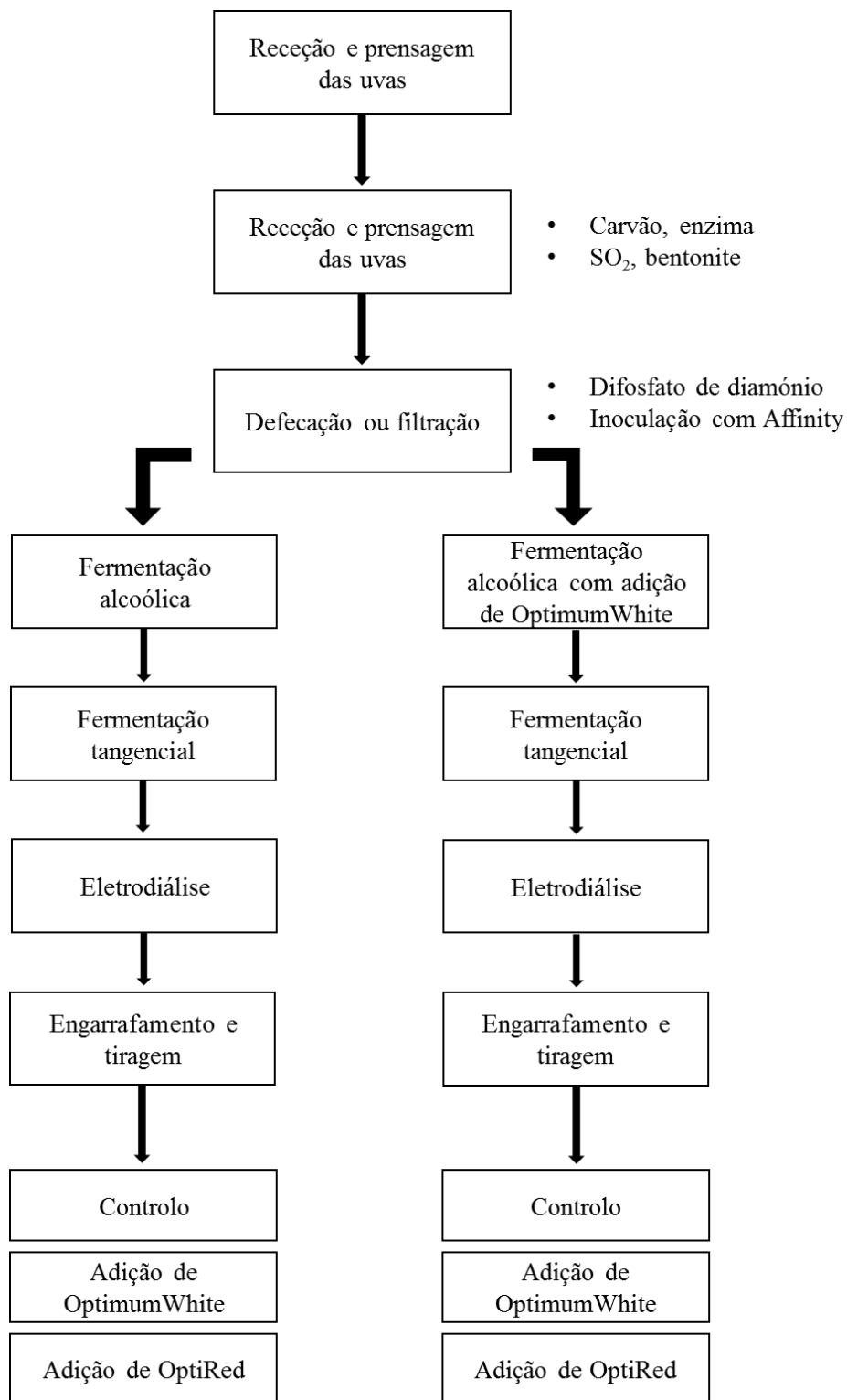


Figura 12 - Esquema geral do processo de vinificação.

2. Análises físico-químicas

2.1. Determinação da estabilidade tartárica

Antes de se efetuar o tratamento do vinho por eletrodialise, é necessário conhecer a taxa de desionização a que é necessário tratar o vinho para que fique estável.

Para isso utilizou-se um método desenvolvido na INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*), denominado teste D.I.T. (*Degré d'Instabilité Tartrique*)(43), utilizado com o objetivo de otimizar as condições para uma precipitação rápida dos cristais de hidrogeno tartarato. Este é um teste de condutividade, realizado num instrumento automatizado, o Stabilab™, e que foi desenvolvido para fornecer informações detalhadas para a determinação do nível de eletrodialise necessário à estabilização do vinho.

Este teste consiste num banho de temperatura controlada a -4°C, com agitadores para mexer constantemente o vinho sob teste e sondas de condutividade para medir continuamente as mudanças na condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$). O método consiste em colocar a amostra de vinho no banho, havendo uma leitura da condutividade à temperatura ambiente, seguidamente ocorre um abaixamento da temperatura até aos -4°C, e após a adição de 4g/L de hidrogeno tartarato de potássio (HTK) é medida a condutividade, de 10 em 10 min, ao longo das 4 h de teste. Os cristais precipitam naturalmente resultando numa diminuição da condutividade do vinho. Os resultados são extrapolados para um tempo infinito através de um modelo matemático do software Mannostab™, sendo a instabilidade dada pela percentagem de diminuição da condutividade obtida no teste (Anexo 2 e 3).

Para avaliar a estabilidade final do vinho, realiza-se um teste, denominado de ISTC50 (*Index de Stabilité Tartaric Critique*). (43) O teste consiste na dissolução de uma dose de referência de 50 mg de HTK em 100 mL de amostra de vinho, causando instabilidade tartárica. Esta dose de HTK é dissolvida a 36°C, com agitação. De seguida baixa-se a temperatura até -4°C, ficando a amostra sob agitação durante 2 h, com monitorização da condutividade, em intervalos de 10 min.

É, de seguida, calculado o tempo que leva até uma diminuição da condutividade, sendo que para se considerar o vinho estável tem de existir uma diminuição de 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ entre os 40 e 120 min (Anexo 3 e 4).

2.2. Análise dos parâmetros enológicos

Para assegurar o controlo e a qualidade do produto realizaram-se análises a parâmetros como teor alcoólico, pH, acidez total, acidez volátil, massa volúmica, dióxido de enxofre livre e total, e turbidez. Estas análises permitem a identificação rápida e atempada de problemas e auxiliam na melhoria e manutenção da qualidade dos vinhos, assim como um rigoroso controlo de qualidade e segurança alimentar.

A evolução dos parâmetros enológicos dos dois vinhos foi determinada nas instalações da empresa Aliança- Vinhos de Portugal.

Teor alcoólico

O teor alcoólico dos vinhos foi determinado por espectrometria de infravermelho próximo (NIR), utilizando o equipamento da marca Anton Paar (modelo *Alcolyser wine*).

pH

O pH dos vinhos foi determinado usando um medidor de pH da marca “CRISON” (titro Matic 2S-3B).

Acidez total

A acidez total foi determinada por titulação, usando uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M. O indicador utilizado foi o azul de bromotimol, que muda de cor a pH 7. A 10 mL de amostra adicionou-se 1 mL de azul de bromotimol e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M até se obter uma cor azul esverdeada.

A acidez total, expressa em gramas de ácido tartárico por L (g/L), foi obtida pela expressão:

$$Acidez\ total = 0,75 * V * Fc$$

onde, V é o volume, expresso em mL, da solução de NaOH 0,1 M gasto na titulação e Fc o fator de correção (0,998) da mesma solução.

Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada pela separação dos ácidos voláteis presentes no vinho por arrastamento numa corrente de vapor de água seguida de retificação, condensação e titulação. Para remover o CO₂, introduziram-se 50 mL de vinho num balão de 500 mL e colocou-se cerca de 2 mins em ultrassons. A destilação foi realizada com cerca de 300 mL de água desmineralizada. No balão de destilação foram colocados 10 mL de vinho e adicionaram-se 0,5 g de ácido tartárico. Titulou-se o destilado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando a solução alcoólica de fenolftleína como indicador até à obtenção da coloração rosa. De seguida, procedeu-se à titulação do dióxido de enxofre livre. Adicionou-se 2 mL de cozimento de amido e 5 mL de ácido sulfúrico a 25% (v/v) e titulou-se com iodo 0,05 M, até à obtenção de uma coloração azul arroxeadada.

A acidez volátil expressa em gramas de ácido acético por L (g/L) foi obtida pela expressão:

$$\text{Acidez volátil} = [(V_{\text{NaOH}} * Fc_{\text{NaOH}}) - (V_{\text{iodo}} * Fc_{\text{iodo}})] * 0,6$$

onde, V_{NaOH} é o volume gasto na titulação do destilado e Fc_{NaOH} o seu fator de correção correspondente (1,015); V_{iodo} é o volume gasto na titulação do dióxido de enxofre livre e Fc_{iodo} o seu fator de correção correspondente.

Massa volúmica

A massa volúmica foi determinada por aerometria e feita a correção em função da temperatura.

Mediram-se para uma proveta, evitando a formação de bolhas, cerca de 250 mL de vinho. Introduziu-se o areómetro limpo, homogeneizou-se fazendo rodar o aerómetro sobre si mesmo e deixando-se imobilizar. Efetuou-se a leitura da massa volúmica aparente e da temperatura (t) usando um termómetro.

A massa volúmica a 20°C (ρ_{20}) expressa em gramas por mL (g/mL) é dada por:

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \left(\frac{c}{1000}\right)$$

-, se t é inferior a 20°C

Materiais e métodos

+, se t superior a 20°C

e onde, c é o termo de correção, em função do teor alcoólico correspondente à temperatura do vinho no momento da leitura, e pt a massa volúmica à temperatura t .

Dióxido de enxofre livre

O dióxido de enxofre livre (SO_2 livre) foi determinado pelo método Ripper.

Num erlenmeyer, introduziram-se 50 mL de vinho, juntaram-se 5 mL de ácido sulfúrico a 25% (v/v) e 2 mL de amido a 5 g/L. Titulou-se com iodo a 0,05 M, até à obtenção de uma coloração azul arroxeada.

O teor de SO_2 livre expresso em miligramas por dm^3 (mg/dm^3) arredondado às unidades é dado pela expressão:

$$SO2L = 64 * V * Fc$$

onde, V o volume, expresso em mL, da solução de iodo 0,05 M gasto na titulação, e Fc o fator de correção de iodo 0,05 M.

Dióxido de enxofre total

O dióxido de enxofre total (SO_2 total) foi determinado pelo método Ripper simples.

Num erlenmeyer, introduziram-se 50 mL de vinho, juntaram-se 20 mL de hidróxido de sódio 1 M e aguardou-se 15 min. De seguida, adicionaram-se 10 mL ácido sulfúrico a 25% (v/v) e 2 mL de amido a 5 g/L. Titulou-se com iodo a 0,05 M, até à obtenção de uma coloração azul arroxeada.

O teor de SO_2 total expresso em miligramas por L (mg/L) arredondado às unidades é dado pela expressão:

$$SO2T = 64 * V * Fc$$

onde, V o volume, expresso em mL, da solução de iodo 0,05 M gasto na titulação, e Fc o fator de correção de iodo 0,05 M.

Turbidez

A turbidez foi determinada por nefelometria, usando um equipamento da marca Hanna Instruments (modelo HI 83749).

2.3. Determinação dos compostos fenólicos totais

O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. (45) Os isopolifosfotungstos são incolores no estado de valência oxidado 6^+ do metal e os compostos de molibdênio são amarelos. Estes formam complexos heteropolifosfotungstos-molibdatos que sendo reduzidos por iões da amostra, assumem uma coloração azul, com máximo de absorção a 760 nm. Os iões provenientes da amostra são obtidos utilizando, geralmente, uma solução concentrada de carbonato de sódio, o que produz uma quantidade significativa de iões fenolatos.

Os produtos da redução dos óxidos de metal são medidos espectrofotometricamente, sendo a intensidade da luz proporcional à concentração de compostos fenólicos presentes na amostra.

Num tubo de cultura adicionaram-se 125 μL de vinho, 500 μL de água destilada e 125 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se e deixou-se a reagir durante 5 min. De seguida, adicionaram-se 1250 μL de uma solução de carbonato de sódio (75g/L) e 1000 μL de água destilada. Deixou-se a reagir durante 90 minutos no escuro à temperatura ambiente e a absorvância foi lida a 760 nm no espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer). O branco preparado consistiu na substituição do volume da amostra (125 μL) pela solução modelo de vinho (água, 10 % etanol, 5,0 g/L ácido tartárico).

Para a curva de calibração do método utilizou-se o ácido gálico como padrão em soluções com diferentes concentrações (0 - 250 mg/L de ácido gálico) cujo solvente era uma solução hidroalcoólica a 10% (v/v). Todas as leituras foram efetuadas em triplicado e os resultados são expressos em mg/L equivalentes de ácido gálico.

2.4 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos vinhos foi determinada pelo método do ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS (44).

O ABTS é convertido no seu catião radical, ABTS^{•+}, por adição do persulfato de potássio. Esta reação origina um cromóforo azul/verde, que na presença de compostos dadores de hidrogénio ou de eletrões, é reduzido tornando-se incolor. Assim, a descoloração ocorrida nesta reação, pode ser convertida numa percentagem de inibição do ABTS^{•+}, sendo esta proporcional à concentração do composto antioxidante.

A solução de ABTS^{•+} 7 mM foi preparada em persulfato de potássio 2,45 mM. A solução foi mantida à temperatura ambiente durante 12-16 h para a formação do radical.

Diluíram-se 1 mL da solução de ABTS^{•+} em 80 mL de etanol. A 50 µL de cada uma das amostras de vinho foi adicionado 1 mL de solução de ABTS^{•+} diluída. Agitou-se e deixou-se a reagir no escuro durante 15 min. A absorvância foi medida a 734 nm num espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/Vis). O branco preparado consistiu na substituição do volume da amostra (50 µL) pela solução modelo de vinho (água, 10 % etanol, 5,0 g/L ácido tartárico).

Para a curva de calibração do método utilizou-se o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como padrão em soluções com diferentes concentrações (0 - 400 µM de Trolox).

Todas as leituras foram efetuadas em triplicado. A percentagem de inibição foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs branco}} * 100$$

onde Abs branco é o valor da absorvância do branco, e Abs amostra é o valor da absorvância das amostras de vinho.

2.5. Análise da composição em catiões

Para a análise à composição em catiões dos vinhos em estudo, utilizou-se o método de Espectroscopia de Absorção Atómica de Chama. Estas análises realizaram-se no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro (LCA) e nos laboratórios da empresa Aliança- Vinhos de Portugal.

No LCA, realizaram-se as determinações dos catiões potássio, magnésio, molibdénio, cálcio, sódio, zinco, cobre, ferro, cobalto e molibdénio, correspondentes às amostras antes e após a eletrodiálise, dos dois vinhos base, Affinity e Affinity+OPMW, e também às amostras dos ensaios de vinho espumante com adição de enológicos:

- 1) do vinho Affinity: Affinity controlo, Affinity+OPMW e Affinity+OPTIRED
- 2) do vinho Affinity+OPMW, Affinity+OPMW controlo, Affinity+OPMW+OPMW, Affinity+OPMW+OPTIRED

Nos laboratórios da Aliança- Vinhos de Portugal, os catiões analisados foram ferro, cobre, sódio e cálcio, correspondentes às amostras antes e após filtração tangencial e após o tratamento por eletrodiálise, dos dois vinhos base, Affinity e Affinity+OPMW. As determinações foram realizadas num espectrómetro de absorção atómica da marca Perkin Elmer, modelo 3110.

3. Análises estatísticas

A análise estatística, foi realizada através do *teste F e do teste t-Student* no programa Excel 2013.

As diferenças entre as determinações foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Análise sensorial

Os vinhos foram sujeitos a uma análise sensorial que teve lugar numa sala de provas da Aliança, no dia 30 de Abril de 2015. Para a análise sensorial dos vinhos espumantes, realizou-se uma prova cega e foi utilizado um painel com 11 elementos, incluindo os enólogos da empresa.

Materiais e métodos

Todos os vinhos para prova foram apresentados em copos de vidro identificados com um código aleatório composto por 3 dígitos. Para a caracterização dos produtos avaliaram-se os seguintes parâmetros: cor (intensidade de cor, amarelo, verde e rosa), aroma (intensidade do aroma, frutado, floral e fresco) e gosto (intensidade, acidez, amargo e persistência). A espuma foi também avaliada em quantidade (abundante, normal e escassa), estabilidade (persistente e momentânea) e efervescência (rápida, normal e lenta). A escala utilizada foi de 1 (Inexistente) a 6 (Muito Intenso) e para a apreciação global do vinho foi utilizada uma escala hedónica que varia entre 0 (Muito Fraco) até 20 (Muito Bom). (Ficha de prova em Anexo)

IV. Resultados e Discussão

IV. Resultados e Discussão

As membranas usadas para eletrodialise na estabilização tartárica devem cumprir certas normas com vista a que a sua utilização não modifique as características físico-químicas e sensoriais do vinho.

Assim nos dois vinhos em estudo, o vinho fermentado pela levedura e o vinho fermentado pela mesma levedura com adição do produto enológico OPMW, efetuou-se um controlo ao longo do processo de vinificação. Desde o término da primeira fermentação alcoólica até ao final do tratamento por eletrodialise, ambos os vinhos foram analisados em parâmetros como teor alcoólico, pH, acidez total, massa volúmica, extrato seco, teor de dióxido de enxofre livre e turbidez.

1. Determinação da estabilidade tartárica do vinho base

Antes de se efetuar o tratamento do vinho por eletrodialise, é necessário conhecer a taxa de desionização a que se vai tratar o vinho para que fique estável, para isso realizou-se um teste de condutividade.

Os resultados obtidos da condutividade ao longo do tempo no teste D.I.T., assim como a condutividade convertida para os dois vinhos em estudo encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do teste D.I.T.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Vinho Affinity		Vinho Affinity+OPMW	
		Condutividade medida	Condutividade convertida	Condutividade medida	Condutividade convertida
-4.0	0	774	1592	761	1536
-4.0	10	724	1489	714	1441
-4.0	20	683	1404	675	1362
-4.0	30	659	1355	653	1318
-4.0	40	647	1330	642	1295
-4.0	50	639	1314	636	1283
-4.0	60	634	1304	631	1273
-4.0	70	630	1295	628	1267
-4.0	80	628	1291	624	1253
-4.0	90	625	1285	623	1249
-4.0	100	624	1283	621	1245
-4.0	110	621	1277	619	1243
-4.0	120	619	1273	617	1241
-4.0	130	618	1271	616	1239
-4.0	140	617	1269	615	1237
-4.0	150	616	1267	614	1239
-4.0	160	614	1262	613	1235
-4.0	170	614	1260	612	1233
-4.0	180	613	1258	611	1233
-4.0	190	612	1256	611	1233
-4.0	200	611	1256	611	1231
-4.0	210	611	1256	610	1229
-4.0	220	611	1256	609	1227
-4.0	230	611	1256	608	1227
-4.0	240	610	1254	608	1227

Na tabela 4, encontram-se representados os valores de condutividade medida diretamente na amostra a -4°C e da condutividade convertida para a temperatura inicial a que se encontrava a amostra ao longo das 4h do teste. Por observação da tabela, à temperatura de -4°C ocorre uma descida na condutividade de ambos os vinhos até aos 200 min, altura em que se inicia uma estabilização na condutividade. Assim, ao longo do teste os dois vinhos Affinity e Affinity+OPMW sofreram um decréscimo de condutividade de cerca de 20%.

A condutividade de um vinho é uma medida objetiva da concentração de iões em solução, sendo o potássio o principal catião encontrado no vinho, normalmente mais de dez vezes a concentração dos iões sódio e cálcio. Assim, a descida da condutividade nos dois vinhos é essencialmente devido à precipitação dos cristais de hidrogeno tartarato de potássio,

que conduzem a uma diminuição do conteúdo em potássio em solução e, portanto, da condutividade.

Tabela 5 - Condutividade dos vinhos ao longo de 4 h e os coeficientes de conversão calculados.

	Vinho Affinity	Vinho Affinity+OPMW
D.I.T	Não tratado	Não tratado
Condutividade inicial ($\mu\text{s/cm}$)	1592	1536
Condutividade após 4 h ($\mu\text{s/cm}$)	1254	1227
% diminuição após 4 h	21,2	20,1
Condutividade após 24 h ($\mu\text{s/cm}$)	1235	1210
% diminuição após 24 h	22,4	21,2
Condutividade infinita ($\mu\text{s/cm}$)	1232	1207
Taxa de tratamento %	22,6	21,4
Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	19,0	20,5

Com base nas medições de condutividade durante as 4 h, na tabela 5 encontram-se representadas as condutividades dos dois vinhos convertidas à temperatura inicial a que estava o vinho (19,0 $^{\circ}\text{C}$ para o vinho Affinity, 20,5 $^{\circ}\text{C}$ para o vinho Affinity+OPMW), a condutividade obtida após 4h e a respetiva percentagem de diminuição, a condutividade extrapolada a 24h e a um tempo infinito. Esta extrapolação indica-nos o valor da condutividade a longo termo para o vinho. Por fim, encontra-se o grau de instabilidade tartárica do vinho, representado como taxa de eletrodialise, que é a taxa de tratamento necessária para a obtenção de um vinho estável. No caso do vinho Affinity, a taxa de tratamento de remoção de iões foi de 22,6% enquanto que para o vinho Affinity+OPMW, a taxa de tratamento foi de 21,4%.

Após o tratamento por eletrodialise, e para avaliar a estabilidade final do vinho, realiza-se um outro teste, denominado ISTC50 (*Index de Stabilité Tartaric Critique*). Os

resultados obtidos na determinação de estabilidade dos dois vinhos em estudo encontra-se representado na Tabela 6.

Tabela 6 - Condutividade dos vinhos durante 120 min a -4°C.

Vinho Affinity			Vinho Affinity+OPMW		
°C	Min.	Condutividade (µs/cm)	°C	Min.	Condutividade (µs/cm)
-4.0	0	603	-4.0	0	616
-4.0	20	594	-4.0	20	607
-4.0	40	593	-4.0	40	605
-4.0	60	592	-4.0	60	604
-4.0	80	592	-4.0	80	603
-4.0	100	591	-4.0	100	603
-4.0	120	591	-4.0	120	603

Neste teste, provoca-se a destabilização do vinho por dissolução de cristais de HTK, a 36°C, e seguidamente há um abaixamento da temperatura para -4°C. Tanto para o vinho Affinity como para o vinho Affinity+OPMW, no final das 2h de teste, houve uma redução de 2% das suas condutividades. Esta diminuição de condutividade representa a diminuição da quantidade de potássio em solução, indicando a ocorrência da precipitação de cristais de HTK. Com uma redução de apenas 2% da condutividade das amostras em teste e sendo que, o vinho é considerável estável se o abaixamento da condutividade é de < 3 µS/cm entre 40 e 120 min a -4°C, as duas amostras de vinho foram consideradas estáveis após o tratamento por eletrodialise.

2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo da vinificação do vinho base

No controlo da evolução dos parâmetros enológicos, as etapas estudadas foram as correspondentes ao final de fermentação, antes e após o processo de filtração tangencial, e após o tratamento por eletrodialise.

2.1. Teor Alcoólico

Um dos parâmetros mais importantes num vinho é o conteúdo de álcool, devido à sua influência nas características organolépticas. Os teores alcoólicos dos vinhos ao longo do processo de vinificação, após fermentação, encontram-se representados na Figura 13.

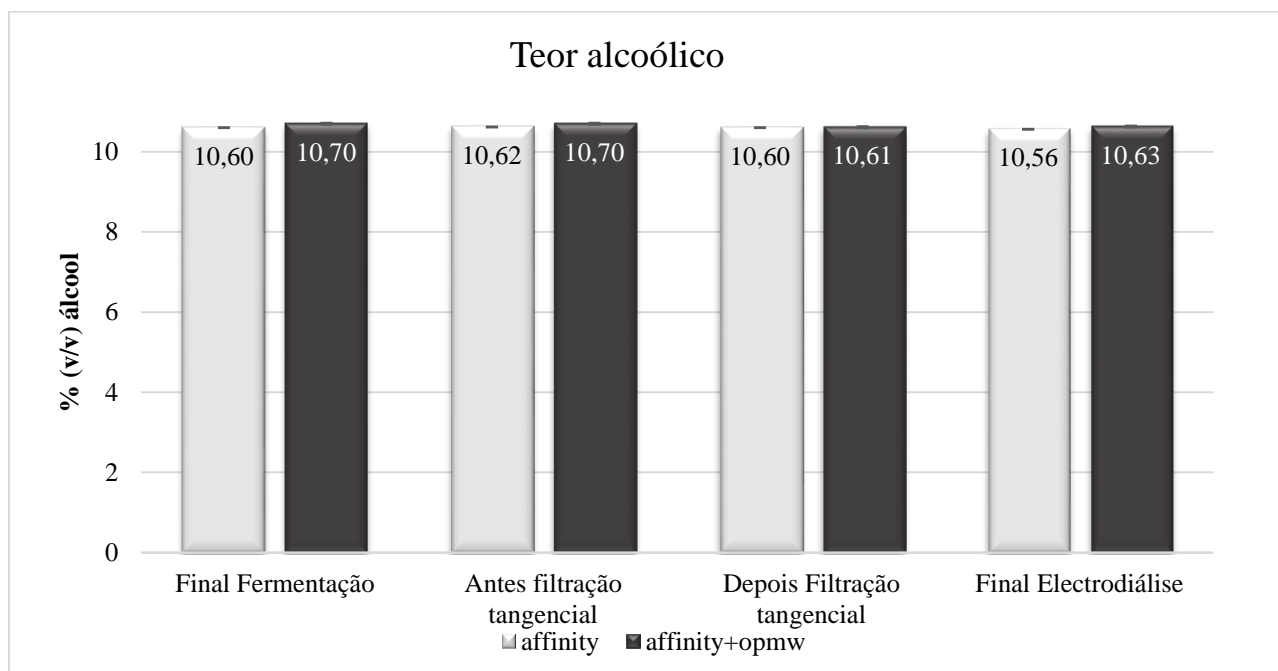


Figura 13 - Teores alcoólicos dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW ao longo do processo de vinificação.

Pela observação dos resultados, conclui-se que o teor alcoólico dos dois vinhos não sofreu variações desde o final de fermentação, sendo que nem a filtração tangencial nem a eletrodialise, afetam o vinho neste parâmetro. Assim, o tratamento dos vinhos por eletrodialise não tem influência no teor alcoólico, e a redução do teor alcoólico foi inferior a 0,1% vol, estando de acordo com o descrito na bibliografia (47). Este conteúdo em álcool

é ainda adequado a um vinho base para espumante, já que a segunda fermentação em garrafa confere cerca de 1,5% de álcool a mais que o teor existente no vinho base. (14)

2.2. pH

Os vinhos são misturas de ácidos fracos, que combinados formam sais. A proporção de sais também depende da sua origem geográfica, variedade de uva, a forma como as vinhas são tratadas, e os métodos de vinificação. O pH é um dos parâmetros mais importantes na qualidade de um vinho, dada a sua influência na estabilidade microbiológica, físico-química e na solubilidade dos tartaratos. (6)

O pH dos vinhos em estudo ao longo do processo de vinificação encontra-se representado na Figura 14.

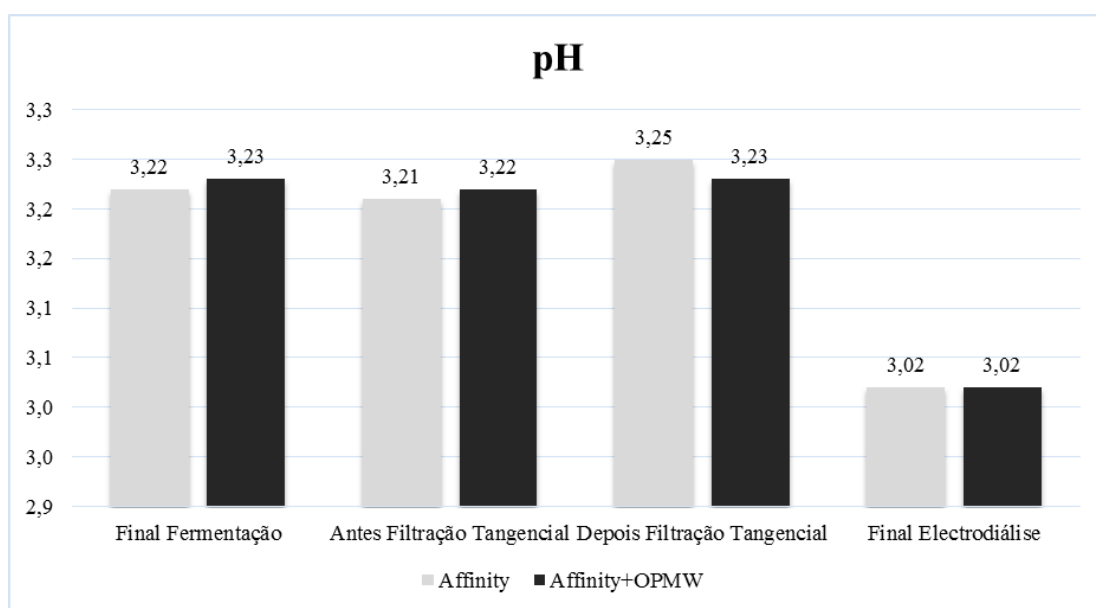


Figura 14 - Variação do pH dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

Pelos resultados observados na figura 14, conclui-se que ambos os vinhos não sofreram alterações no seu pH com a filtração tangencial, já que no final de fermentação, o vinho Affinity tinha um pH de 3,22 e no final da filtração, este valor era de 3,25, e em relação ao vinho Affinity+OPMW não houve variação alguma, já que o pH foi de 3,23 no final de final de fermentação e também no final da filtração tangencial.

Já com o tratamento por eletrodialise observou-se uma diminuição do pH na ordem das 0,2 unidades, 3,2 para 3,0 nos dois vinhos. No vinho Affinity, com pH de 3,22 no final de fermentação sofreu um decréscimo para 3,02 após a eletrodialise, e o vinho Affinity+OPMW sofreu uma redução de 3,23 para 3,02. Este decréscimo é justificado pelo facto das membranas de eletrodialise retirarem cations podendo causar variações de pH. As membranas são filmes de 100-200 μ m de espessura, compostas por grupos funcionais ionizados inseridos numa matriz. (17) A cinética de transferência de iões de uma dada membrana a uma determinada força iónica depende de vários parâmetros, incluindo a dimensão e mobilidade do soluto, o que define a constante de velocidade. Essas variáveis explicam as diferenças de migração observada quando iões diferentes são tratados com membranas diferentes (48).

O efeito sobre o pH pelo processo de eletrodialise é devido às ações opostas criadas pelas membranas catiónicas e aniónicas. Assim, a diminuição efetiva do pH é devido à extração dos aniões que se verifica ser mais lenta que dos cations, já que cations como potássio são facilmente extraídos dada a sua elevada mobilidade.

2.3. Acidez total

Para a acidez total do vinho contribuem todos os tipos de ácidos, tanto os inorgânicos, como os orgânicos, sendo a ácido tartárico o principal. A acidez total do vinho é um parâmetro importante no equilíbrio do sabor, para o qual contribuem os açúcares e álcoois (sabor doce), os ácidos orgânicos e inorgânicos (sabor ácido) e os fenóis (sabor amargo).

A acidez total dos vinhos em estudo ao longo da vinificação encontra-se representada na Figura 15.

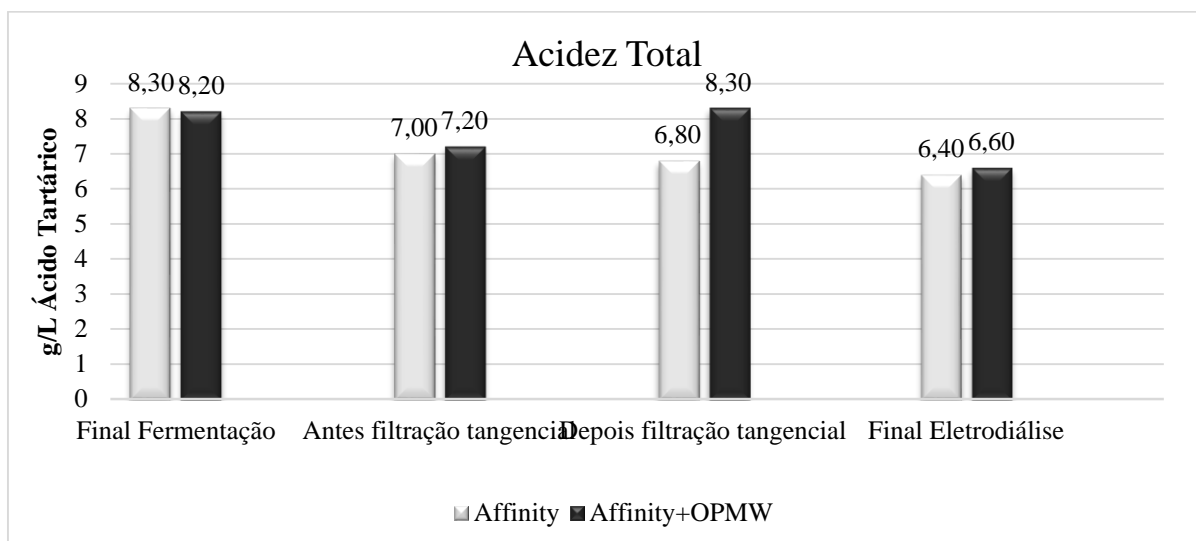


Figura 15 - Variação da acidez total dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que desde o final da fermentação até ao momento da filtração tangencial, houve uma redução na acidez total de ambos os vinhos, justificada pela precipitação de ácidos orgânicos. (21) Com o processo de filtração tangencial, o vinho Affinity teve um ligeiro decréscimo de 7,0 g/L ácido Tartárico para 6,8 g/L ácido tartárico, enquanto que o vinho Affinity+OPMW teve um ligeiro aumento passando de 7,2 g/L ácido Tartárico para 8,3 g/L de ácido tartárico. Este valor é atípico, sendo assumido como um erro de determinação.

Contudo, com o tratamento por eletrodialise observa-se uma ligeira diminuição da acidez total em ambos os vinhos. Este resultado é concordante com a diminuição de pH observada, devido à diminuição da quantidade de ácido tartárico, na forma de anião hidrogeno tartarato, retirado pelo processo de eletrodialise.

2.4. Acidez volátil

A acidez volátil é um indicador importante de que um vinho pode estar alterado, sendo que é necessário acompanhar a sua evolução para determinar o seu estado sanitário. Esta propriedade está relacionada principalmente com a quantidade de ácido acético, formado sobretudo durante a fermentação. (48)

A acidez volátil dos vinhos ao longo do processo de vinificação encontra-se representada na Figura 16.

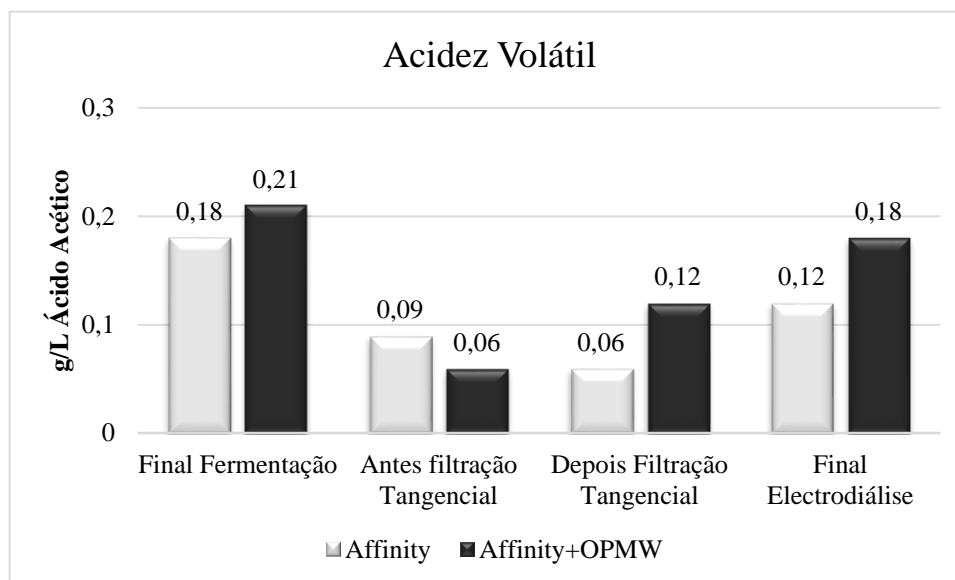


Figura 16 - Variação da acidez volátil dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

A acidez volátil, no final de fermentação, encontrava-se a 0,18 g/ ácido acético para o vinho Affinity e a 0,21 g/ ácido acético para o vinho Affinity+OPMW, o que se justifica pela presença de oxigénio que promove a formação do ácido acético por oxidação do etanol. Ao longo do tempo verifica-se uma tendência para a sua redução nos dois vinhos, e constata-se que a filtração tangencial não afeta o vinho neste parâmetro, ocorrendo uma ligeira subida destes valores após eletrodiálise. Contudo, os valores encontram-se dentro dos limites legais para vinhos brancos, $\leq 1,1$ g ácido acético/L.

2.5 Massa volúmica

Sendo a massa volúmica, uma medida aproximada da quantidade de glucose e frutose contidas no vinho, a sua determinação torna-se essencial para o cálculo do valor de extrato seco. A massa volúmica e os valores de extrato seco dos vinhos em estudo encontram-se representados na Figura 17.

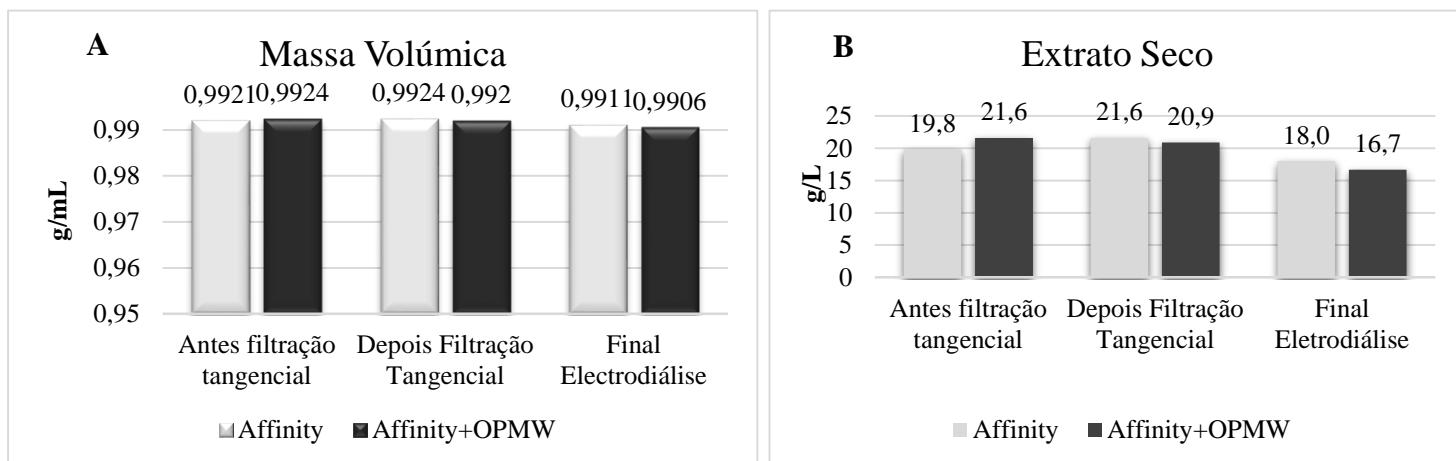


Figura 17 - Variação da A) massa volúmica e do B) extrato seco dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

Segundo os resultados obtidos na determinação da massa volúmica, figura 17 A), verifica-se que nem a filtração tangencial nem eletrodiálise afetam o vinho neste parâmetro.

O extrato seco total é composto por todas as substâncias que não são voláteis. Os seus grupos principais são os minerais, os compostos fenólicos, os açúcares, os polissacarídeos e os ácidos orgânicos. O extrato seco dos vinhos em estudo encontra-se representado na Figura 17 B).

Pelos resultados observados, existe um ligeiro decréscimo nos valores de extrato seco para os dois vinhos em estudo. No vinho Affinity ocorre uma diminuição de 17% no valor do extrato seco após tratamento por eletrodiálise, enquanto que no vinho Affinity+OPMW esta redução é de 20%.

Tendo em consideração que as membranas de eletrodiálise são matrizes densas, não permeáveis a substâncias sem carga elétrica, não seria de esperar uma diminuição nos valores de extrato seco dos vinhos. (35) A pequena diminuição observada está relacionada com a diminuição do teor em ácido tartárico e sobretudo dos minerais retirados aquando do tratamento do vinho por eletrodiálise já que os ácidos orgânicos e os minerais, constituem o extrato seco de um vinho.

2.6 Dióxido de enxofre livre e total

O anidrido sulfuroso é adicionado ao vinho em várias etapas do processo de vinificação, no esmagamento das uvas, no mosto antes de iniciar a fermentação, no final de

fermentação e imediatamente antes do engarrafamento. Este possui duas funções essenciais, antisséptico (SO₂ livre) evitando o crescimento de microrganismos indesejáveis, e antioxidante, limitando a oxidação de alguns compostos. (49,50)

O dióxido de enxofre total corresponde a soma do dióxido de enxofre livre (H₂SO₃) e do combinado com o etanal (CH₃-CHOH-OSO₂H) encontrado no vinho. Quanto à sua concentração no produto final, A União Europeia impõe os limites seguintes para o conteúdo total do anidrido sulfuroso : 160 mg/L para vinhos tintos, 260 mg/L para os brancos e rosés. (21)

Os teores de dióxido de enxofre livre e total dos vinhos em estudo encontram-se representados na Figura 18.

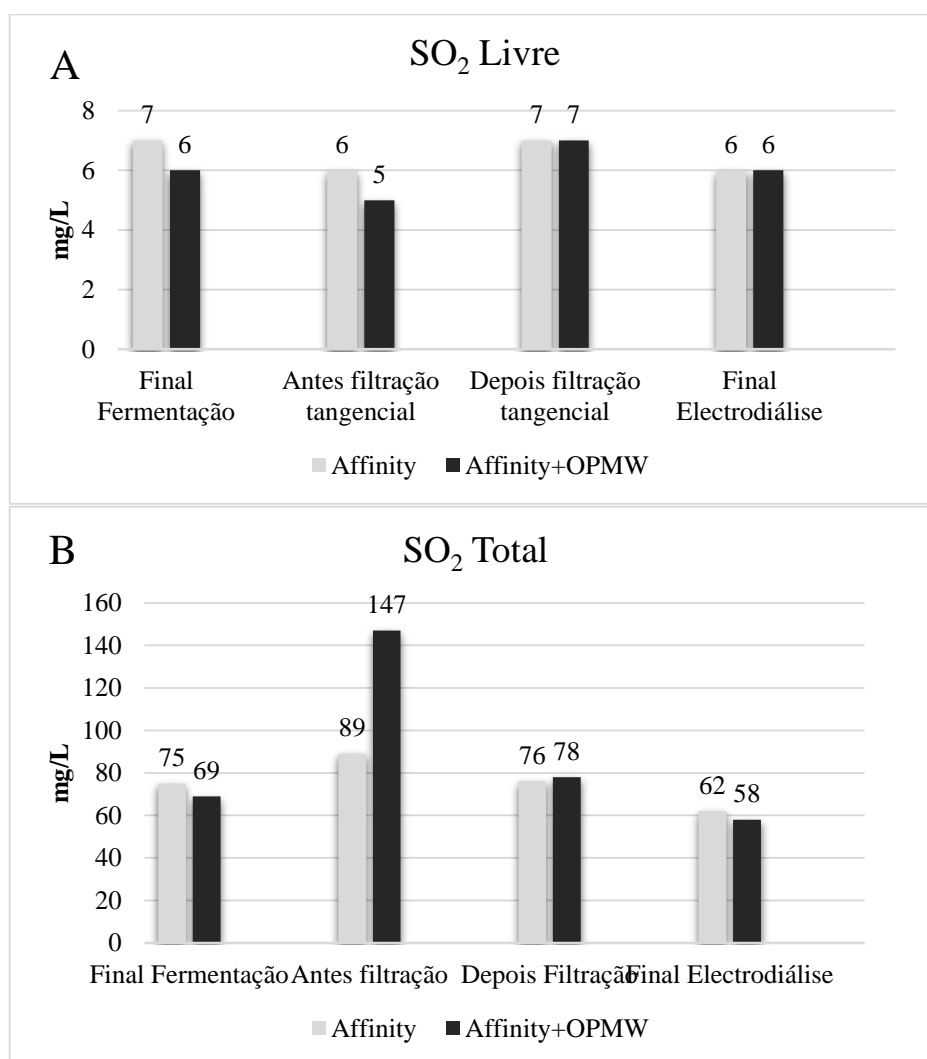


Figura 18 - Variação do A) sulfuroso livre e B) sulfuroso total dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

Quanto às determinações para o anidrido sulfuroso livre, observadas na figura 18 A) observa-se uma ligeira diminuição com o processo de eletrodialise. Em ambos os vinhos este valor era de 7 mg/L após filtração tangencial tendo sofrido uma ligeira redução para 6 mg/L após eletrodialise. Esta redução é justificada pelo facto do SO₂ livre estar presente na forma de bissulfito HSO₃⁻, podendo ser removido, apesar das membranas serem permeáveis essencialmente ao anião tartarato.

Para o dióxido de enxofre total, segundo os resultados observados na figura 18 B), observa-se que a filtração tangencial diminuiu os níveis de dióxido de enxofre total, sendo que no vinho Affinity a redução do seu teor em SO₂ total sofreu uma redução de 15%, e no vinho Affinity+OPMW a sua redução foi de 47%. Observa-se também um decréscimo aquando do tratamento por eletrodialise, sendo que no vinho Affinity esta diminuição foi de 18% e no vinho Affinity+OPMW, foi de 26%.

A diminuição verificada tanto com o processo de filtração tanto com a eletrodialise, deve-se ao facto do anidrido sulfuroso se combinar com o acetaldeído, e outras moléculas como açúcares e antocianinas. Pode ainda ficar retido nas membranas de eletrodialise. (21)

2.7. Turbidez

A turbidez é um parâmetro importante no controlo do vinho e é devida a precipitações que turvam o vinho, afetando o seu aspeto visual. A turbidez é medida avaliando a perturbação na difusão da luz causada por partículas em contacto com um líquido. (48) As proteínas e os polifenóis são responsáveis pela formação de precipitados, o que pode tornar o aspeto do vinho turvo. Estes dois compostos formam complexos solúveis que podem crescer com o tamanho coloidal, formando suspensões que causam a dispersão de luz. A quantidade de turvação está dependente da concentração dos polifenóis e das proteínas, pH, teor alcoólico e temperatura. (51)

A turbidez dos dois vinhos, Affinity e Affinity+OPMW, durante a vinificação encontra-se representada na Figura 19.

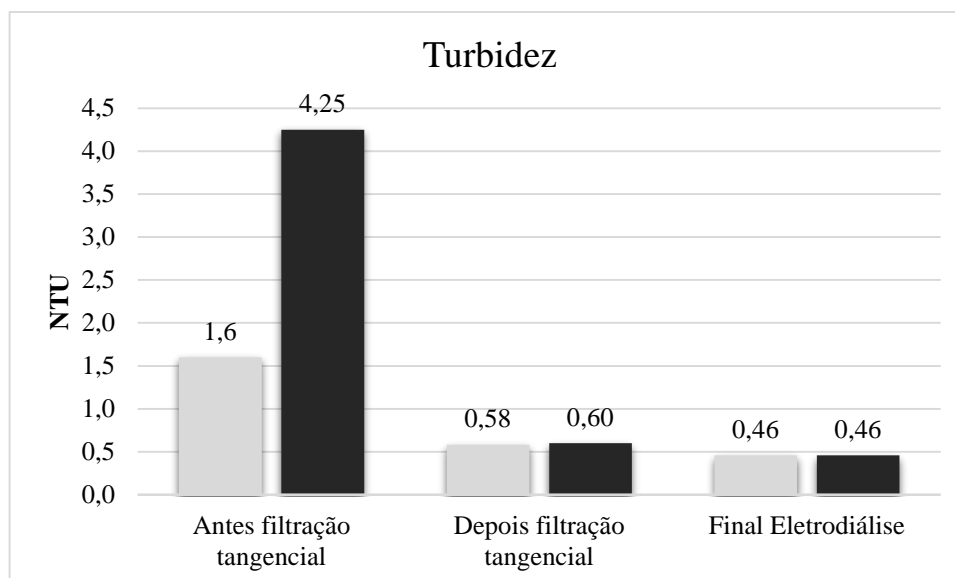


Figura 19 - Variação da turbidez dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW.

De acordo com os resultados observados na Figura 19, houve uma ligeira diminuição nos valores de turbidez dos vinhos com a eletrodialise, contudo o impacto da filtração tangencial é muito maior, sendo que no vinho Affinity, esta redução foi de 64% e no vinho Affinity+OPMW, este decréscimo foi de 86%. Este efeito é justificado pela eliminação de proteínas do vinho, para evitar precipitações futuras, que ocorre com o processo de filtração tangencial. Este processo pode ter algum impacto na qualidade do vinho, já que poderá eliminar macromoléculas importantes nas qualidades organolépticas do vinho. (51)

Ainda em relação à eletrodialise, as membranas de eletrodialise não têm poros (são designadas de membranas densas), e por isso os fenômenos de adsorção são diminutos, daí que o impacto do processo neste parâmetro seja mínimo. (39)

3. Compostos fenólicos

3.1. Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos desempenham funções importantes na qualidade do vinho, contribuindo para seu sabor e aroma. A quantidade desses compostos varia de acordo com fatores como clima, natureza do solo, variedade da uva, maturidade da uva, maceração da uva, temperatura de fermentação, pH, dióxido de enxofre e etanol. A quantidade de compostos fenólicos no vinho tinto é maior (1000-4000 mg/L) do que no vinho branco (200-300 mg/L), sendo que as uvas tintas têm na sua composição as antocianinas, as moléculas responsáveis pela pigmentação, enquanto que as uvas brancas não as detêm. São as catequinas e a epigallocatequinas os compostos fenólicos maioritários do vinho branco, pois estão presentes em maior quantidade no extrato da película da uva branca. (21)

O conteúdo em compostos fenólicos totais dos vinhos em estudo encontra-se representado na Figura 20.

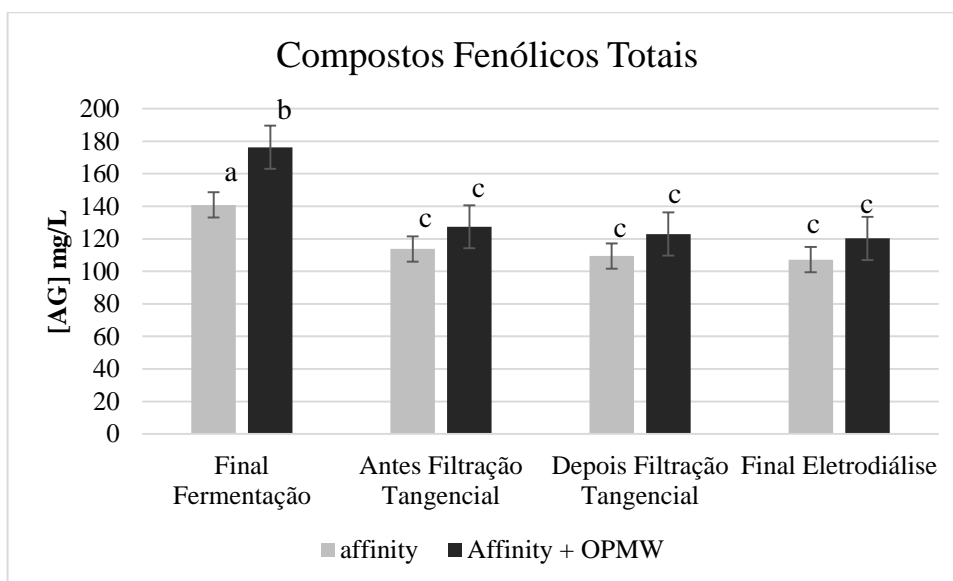


Figura 20 - Evolução dos compostos fenólicos totais (expressos em mg/L eq. ácido gálico) dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Pelos resultados observados na figura 20, conclui-se uma redução do teor em compostos fenólicos ao longo do tempo. A única diferença significativa é na análise de final

de fermentação, e o vinho com adição de produto enológico, Affinity+OPMW, tem um teor de compostos fenólicos mais elevado (180 mg/L em equivalentes de ácido gálico) que o vinho Affinity (140 mg/L em equivalentes de ácido gálico). Contudo, com ao longo do tempo este teor vai diminuindo em ambos os vinhos pela precipitação natural destes compostos. Os processos como a filtração tangencial e eletrodialise não afetam este parâmetro.

3.2. Atividade antioxidante

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre um determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Assim quanto maior o teor em compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante de um vinho. (21)

A atividade antioxidante dos vinhos em estudo encontra-se representada na Figura 21.

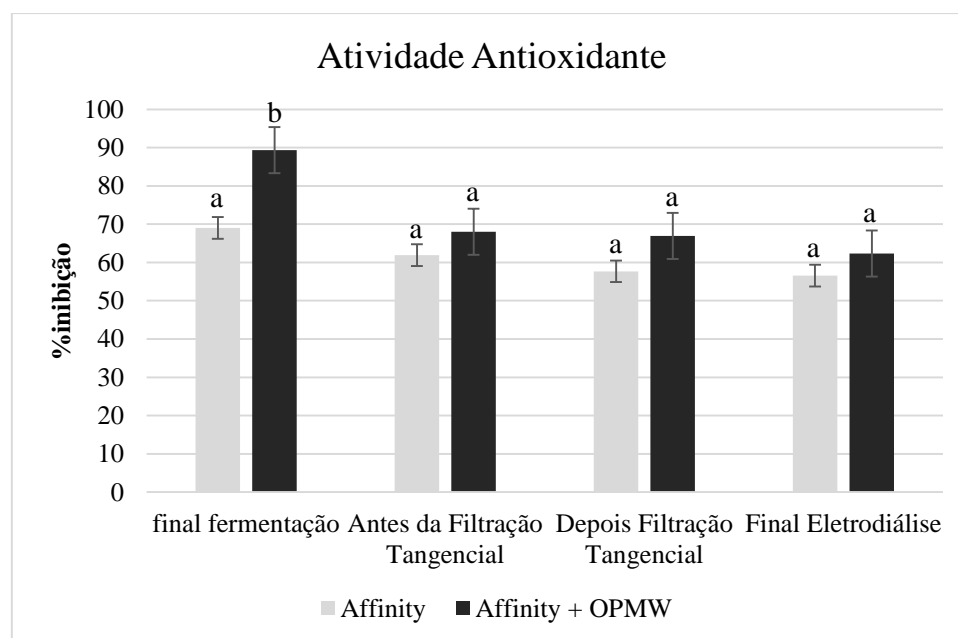


Figura 21 - Evolução da atividade antioxidante (expresso em % de inibição) dos vinhos Affinity e Affinity+OPMW ao longo da vinificação, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Pelos resultados observados na figura 21, observa-se uma diminuição da capacidade antioxidante em ambos os vinhos ao longo do seu processo de vinificação. Esta descida, é confirmada pela diminuição no teor de compostos fenólicos totais dos vinhos.

O vinho ao qual foi adicionado o produto enológico, Affinity+OPMW, possui uma capacidade antioxidante superior ao vinho que não sofreu adição de qualquer produto, Affinity, na etapa do final de fermentação sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os processos de filtração tangencial e eletrodialise não afetam os vinhos neste parâmetro.

4. Análise dos catiões

Um nível adequado de iões no vinho é muito importante, já que em excesso estes podem causar precipitações ou turvações no vinho, e podem ainda ser tóxicos para a levedura no caso dos espumantes, onde se realiza uma segunda fermentação em garrafa. (30,52,53) No entanto, um meio empobrecido em minerais pode ser prejudicial para o papel fermentativo da levedura, conduzindo a fermentações com um arranque complicado ou mais lentas. (54)

Os resultados da análise mineral de ambos os vinhos, antes e após o tratamento por eletrodialise encontram-se representados graficamente nas figuras abaixo. Na Figura 22 A) apresentam-se os valores para a quantificação dos catiões determinados nos laboratórios da Aliança-Vinhos de Portugal, e na Figura 22 B) representam-se as determinações do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

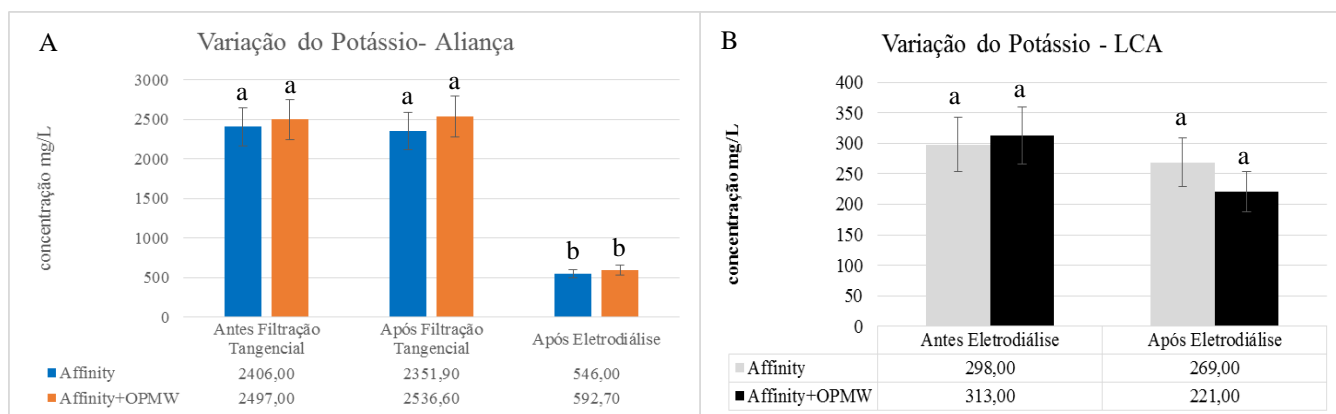


Figura 22 - variação do potássio em A) Aliança e B) LCA, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Quanto ao teor do ião potássio nos vinhos, quanto à determinação na Aliança (Figura 22 A), os resultados observados estão de acordo com o esperado para este ião. Com o processo de filtração tangencial, observa-se que não há variação de potássio, contudo com a eletrodialise há uma diminuição nos níveis deste catião já que este processo retira essencialmente potássio no vinho. A variação de potássio no vinho Affinity e no vinho Affinity+OPMW é ainda de 23%.

Quanto ao teor em potássio determinado no LCA (Figura 22 B), as quantidades mesmo antes o tratamento por eletrodialise são muito baixas e não se observa variação com a eletrodialise. Justifica-se esta discrepância de valores em relação às determinações na Aliança, pelo facto das amostras terem sido congeladas e armazenadas cerca de 3 meses até à sua análise, havendo a eventual precipitação de hidrogeno tartarato de potássio, não sendo este contabilizado na determinação analítica.

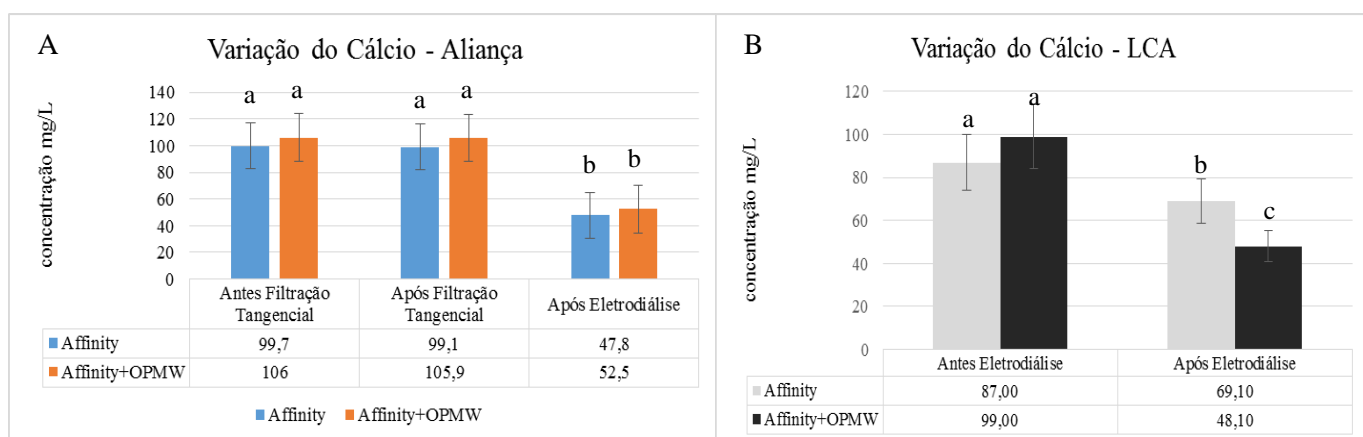


Figura 23 - variação do teor em cálcio determinado na A)Aliança e no B)LCA, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Na Figura 23 encontram-se representadas as variações nos teores de cálcio. O cálcio foi determinado tanto nos laboratórios da Aliança, como no LCA na Universidade de Aveiro. Através da determinação na Aliança, determinou-se que este elemento não variava com o processo de filtração tangencial. Os resultados determinados na Aliança são coerentes com os do LCA. Assim, para o cálcio determinado na Aliança, Figura 23 A, no vinho Affinity o seu teor variou de 99,1 mg/L para 47,8 mg/L com o processo de eletrodialise, enquanto que no vinho Affinity+OPMW a sua variação foi de 105,9 mg/L para 52,5 mg/L . Quanto às determinações efetuadas nos LCA, Figura 23 B, a variação deste elemento no vinho Affinity

Resultados e Discussão

foi de 87,00 mg/L para 69,10 mg/L, e no vinho Affinity+OPMW foi de 99,00 mg/L para 48,10 mg/L.

Assim, após o tratamento por eletrodialise, verificou-se uma diminuição nos níveis de cálcio, pois a eletrodialise é um processo usado na remoção destes íons que tendem a formar precipitados no vinho.

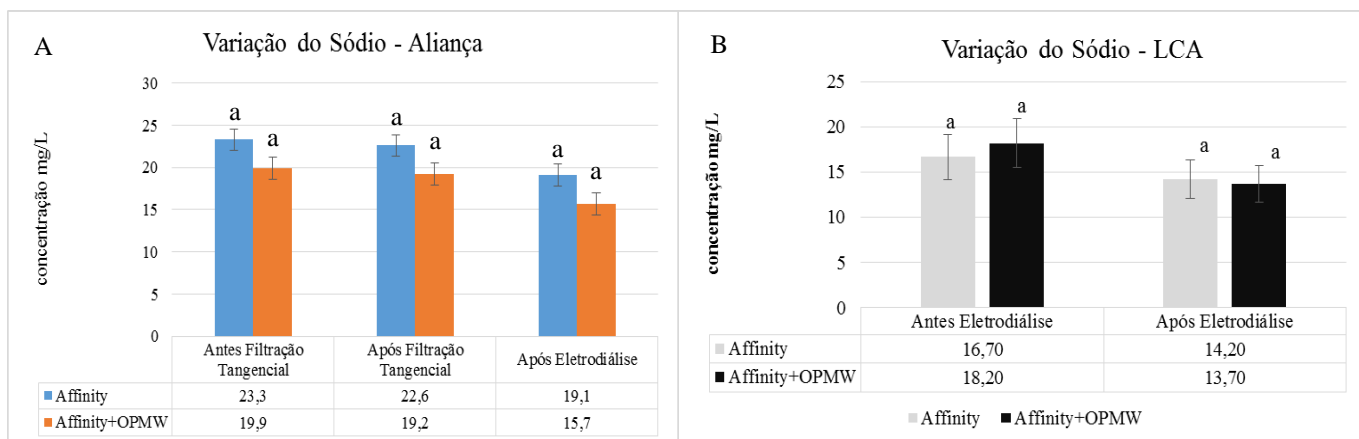


Figura 24 - variação do teor de sódio na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

O sódio não sofre um decréscimo estatisticamente significativo nem nas determinações da Aliança nem no LCA. Ainda assim as determinações na Aliança (Figura 24 A) indicam uma variação de 15 % para o vinho Affinity, e de 18% para o vinho Affinity+OPMW. Nos resultados do LCA, Figura 24 B, esta variação para o vinho Affinity foi de 15% e para o vinho Affinity+OPMW foi de 25%. As duas determinações são coerentes entre si, e os resultados observados são concordantes com os de Santos *et al.* (27), que refere a remoção de certos catiões como sódio.

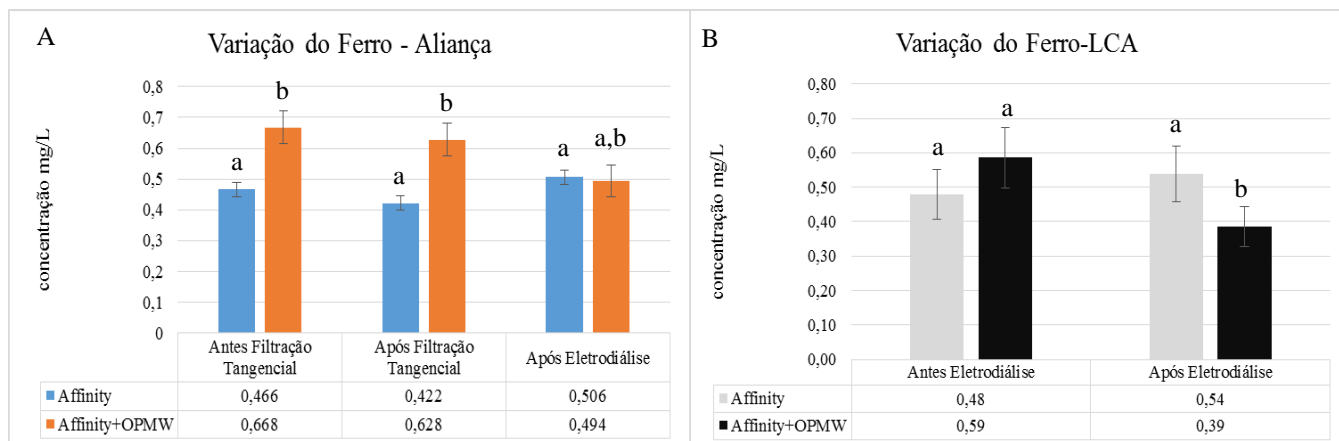


Figura 25 - variação do teor de ferro na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Quanto à variação do teor de ferro, nas determinações da Aliança (Figura 25 A), observa-se que o vinho Affinity+OPMW tem um teor mais elevado em ferro relativamente ao vinho Affinity. Ainda, não se verifica variação com o processo de filtração tangencial nem com a eletrodialise. Já nas determinações do LCA (Figura 25 B) verifica-se uma diminuição em ferro de 34% para o vinho Affinity+OPMW. Nestas determinações, o conteúdo de ferro não era diferente nos dois vinhos.

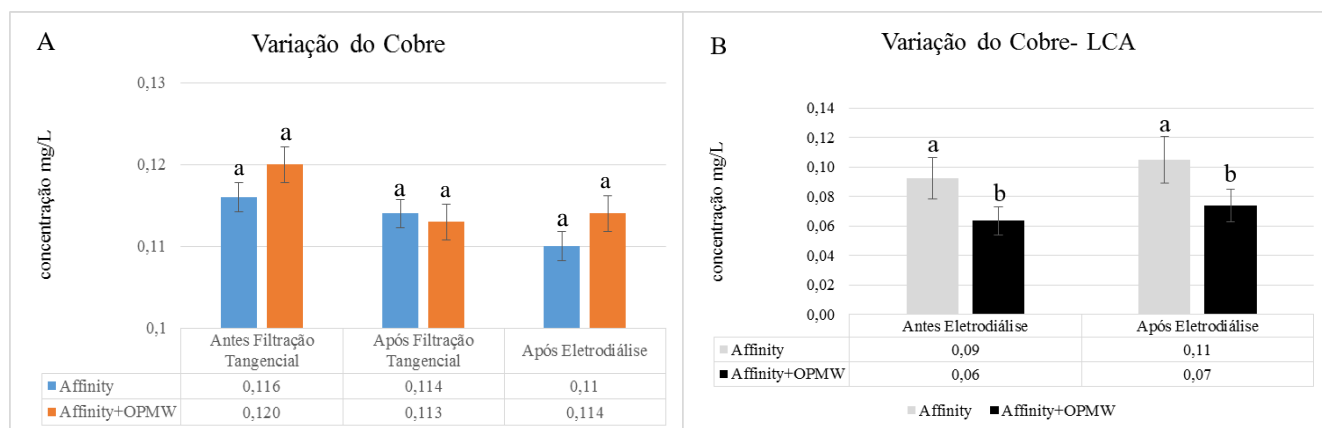


Figura 26 - variação do teor de cobre na A) Aliança, e B) no LCA, em que que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Quanto à variação do cobre, nas determinações da Aliança (Figura 26 A), observa-se que os vinhos têm o mesmo conteúdo em cobre e mais uma vez, não se verifica variação com o processo de filtração tangencial nem com a eletrodialise. O mesmo acontece com as

determinações do LCA, Figura 26 B, em que não se observa uma diminuição de cobre com o processo de eletrodiálise.

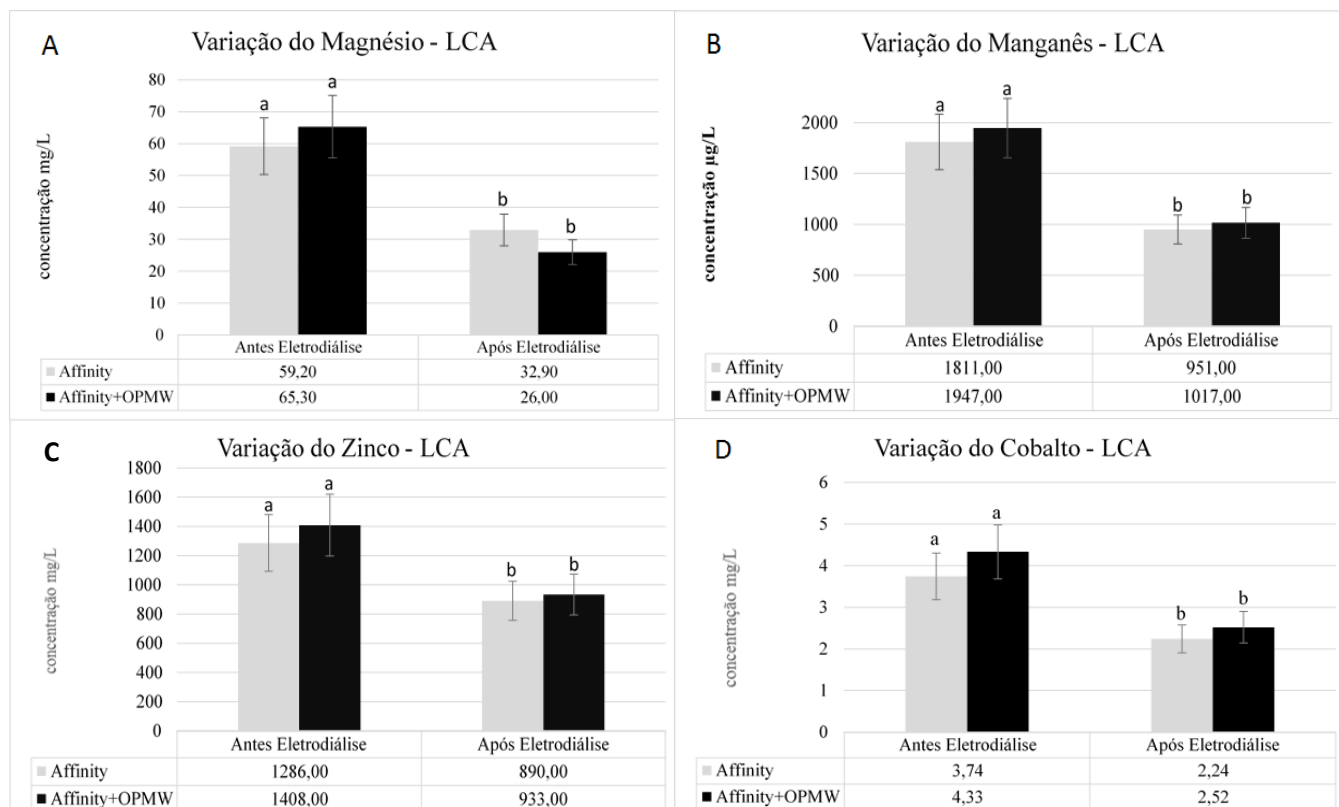


Figura 27 - Conteúdo em A) magnésio, B) manganês, C) zinco e D) cobalto, antes e após o tratamento de eletrodiálise, determinados no Laboratório Central de Análises, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

A concentração de magnésio (Figura 27 A) diminui significativamente em 44% no vinho Affinity (passando de 59,2 mg/L para 32,9 mg/L), e de 60% no vinho Affinity+OPMW (65,3 mg/L contra 26,0 mg/L após eletrodiálise). O manganês (Figura 27 B), sendo um microelemento, também sofre um decréscimo de 47% no vinho Affinity (passando de 1811 $\mu\text{g/L}$ para 951 $\mu\text{g/L}$) e de 48% no vinho Affinity+OPMW (de 1947 $\mu\text{g/L}$ para 1017 $\mu\text{g/L}$ após tratamento). O zinco (Figura 27 C) é outro microelemento com uma diminuição estatisticamente significativa, passando de 1286 $\mu\text{g/L}$ para 890 $\mu\text{g/L}$ no vinho Affinity (decréscimo de 31%), e de 1408 $\mu\text{g/L}$ para 933 $\mu\text{g/L}$ no vinho Affinity+OPMW (decréscimo de 34%). O cobalto (Figura 27 D), no vinho Affinity sofre uma redução de 40% (3,74 $\mu\text{g/L}$ para 2,24 $\mu\text{g/L}$), e no vinho Affinity+OPMW, a redução deste catião é de 42% (4,33 $\mu\text{g/L}$ para 2,52 $\mu\text{g/L}$).

Os resultados observados são concordantes com os de Santos *et al.* (27), que refere a remoção de certos cátions como sódio, cálcio e magnésio, no entanto a remoção de outros cátions além destes não está documentada. Nos vinhos em estudo observa-se um grande impacto do tratamento por eletrodialise na sua composição em iões. Justifica-se esta diminuição pelo facto de serem cátions com maior mobilidade, e que por ação do campo elétrico atravessam a membrana catiónica de eletrodialise. (32,35)

Tabela 7 - Comparação dos valores de minerais dos vinhos em estudo e das concentrações necessárias para o crescimento celular e reprodução das *S. cerevisiae*, em que letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Elemento	Intervalo de referência	Resultados observados após eletrodialise	
		Vinho Affinity	Vinho Affinity+OPMW
K (mg/L)	78-156	269 ± 40,4 ^a	221 ± 33,2 ^a
Mg (mg/L)	48-96	32,9 ± 4,9 ^a	26,0 ± 3,9 ^a
Mn (µg/L)	110-220	951 ± 142,7 ^a	1017 ± 152,6 ^a
Ca (mg/L)	Vestigial < 1 µg/L	69,1 ± 31,8 ^a	48,1 ± 7,2 ^b
Cu (µg/L)	96	105,1 ± 15,8 ^a	73,8 ± 11,1 ^b
Fe (µg/L)	56-168	538 ± 80,7 ^a	386 ± 57,9 ^b
Zn (µg/L)	262-523	890 ± 133,5 ^a	933 ± 140,0 ^a
Mo (µg/L)	63,9	<5	<5
Co (µg/L)	5,9	2,24 ± 0,3 ^a	2,52 ± 0,4 ^a
Na (mg/L)		14,2 ± 2,1 ^a	13,7 ± 2,1 ^a

[Adaptado de Walker (23)]

Por comparação dos níveis de cátions dos vinhos em estudo, com os valores de referência para as concentrações necessárias para o crescimento celular e reprodução das *S. cerevisiae*, concluiu-se que minerais como potássio (com intervalo de referência entre 78 e 156 mg/L), manganês (com intervalo de referência entre 110-220 µg/L), cálcio (vestigial < 1 µg/L), ferro (com intervalo de referência entre 56-168 µg/L) e zinco (com intervalo de referência entre 262-523 µg/L) encontram-se em concentrações superiores às dos valores de referência para a realização de uma fermentação completa.

Os elementos como magnésio (intervalo de referência é 48-96 mg/L), molibdênio (com concentração de referência de 63,9 µg/L) e cobalto (com concentração de referência de 5,9 µg/L) não se encontravam na concentração adequada para que o crescimento celular da levedura.

O cobre, cuja concentração ideal para a levedura é de 96 µg/L, encontra-se em concentração superior no vinho Affinity (105,1 µg/L) mas não no vinho Affinity+OPMW (73,8 µg/L).

Por fim, entre os dois vinhos após o tratamento por eletrodialise, o vinho Affinity demonstra ter níveis mais elevados de cálcio, cobre e ferro, em relação ao vinho Affinity+OPMW, sendo as diferenças de 30%.

Assim, observa-se que o produto OPMW não aumentou os níveis minerais dos vinhos, sendo que é o vinho Affinity que possui níveis mais elevados de íons como cálcio, cobre e ferro.

5. Produção do vinho espumante

5.1. Segunda fermentação em garrafa

Para se acompanhar a evolução das fermentações dos vinhos em estudo, a cinética fermentativa foi controlada pela pressão de CO₂ formado, representado nas Figuras 28 e 29. Os açúcares redutores foram também determinados.

Foram controlados continuamente, os vinhos Affinity controlo e vinho Affinity+OPMW, enquanto que as outras variedades dos ensaios com os produtos OPMW e OPTIRED, foram controladas pontualmente para se concluir acerca da evolução de todas as fermentações.

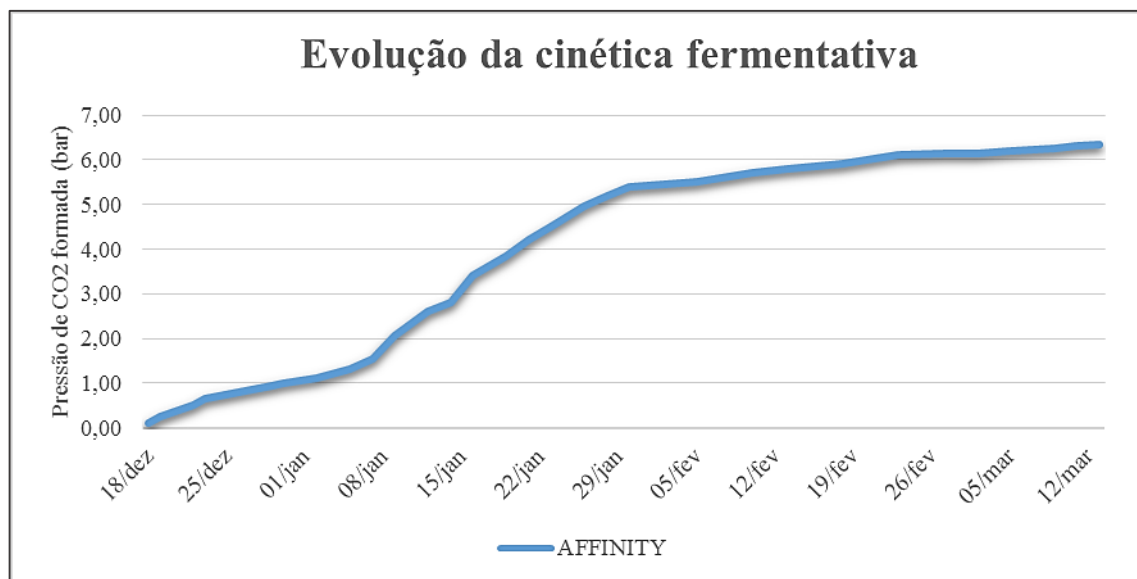


Figura 28 - Cinéticas fermentativas ($T=14^{\circ}\text{C}$) pelas leveduras imobilizadas no vinho Affinity.

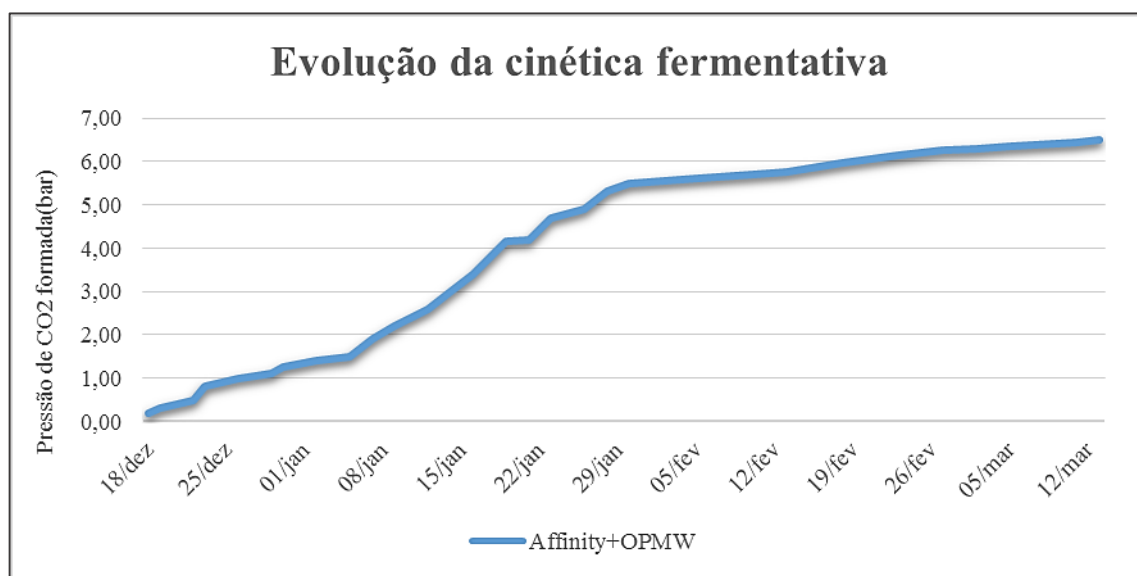


Figura 29 - Cinéticas fermentativas ($T=14^{\circ}\text{C}$) pelas leveduras imobilizadas no vinho Affinity+OPMW.

Para averiguação do término da fermentação realizaram-se análises aos níveis de açúcares redutores em ambos os vinhos (Tabela 8).

Tabela 8 - Determinação dos açúcares redutores nos vinhos espumantes

	Açúcares redutores após 3 meses (g/L)	Açúcares redutores após 4 meses (g/L)
Vinho Affinity controlo	2,35	0,78
Vinho Affinity+OPMW	2,30	0,60
Vinho Affinity+OPTIRED	2,40	0,57
Vinho Affinity+OPMWcontrolo	2,10	0,54
Vinho Affinity+OPMW+OPMW	2,28	0,44
Vinho Affinity+OPMW+OPTIRED	2,50	0,35

A determinação da pressão, que indica a formação de CO₂, permitiu avaliar a evolução da fermentação. Quando a pressão se tornou constante, efetuou-se uma análise dos açúcares redutores. Na primeira análise, os níveis de açúcares ainda se encontravam superiores a 2 g/L, daí que se tenha esperado mais um mês. Passado esse tempo, a análise dos açúcares redutores indicou uns teores de açúcares inferiores a 2g/L para todas as variedades de vinho, o que indica que fermentação alcoólica tinha terminado.

Um conteúdo elevado de açúcares fermentáveis nos vinhos no final de fermentação diminuem a qualidade do vinho, já que vinhos com elevados teores de açúcares residuais são microbiologicamente instáveis. O maior risco resultante deste excesso de açúcar fermentável é o desenvolvimento de bactérias ácidas lácticas cuja ação resulta no desenvolvimento de ácido acético. (54)

Assim a segunda fermentação alcoólica em garrafa decorreu normalmente e ao mesmo tempo em todas as variedades estudadas, tanto pela sua determinação de pressão de CO₂ como pela determinação dos seus açúcares redutores. Ainda para os vinhos Affinity controlo, e Affinity+OPMW controlo, acompanhados continuamente, verificou-se um aumento de pressão até dois meses após o início da fermentação, começando a estabilizar após esse período.

As pressões finais de todas as variedades produzidas encontram-se representadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Pressão de CO₂ nos produtos finais dos ensaios.

	PCO₂ dos produtos finais (bar)
Vinho Affinity controlo	6,35
Vinho Affinity+OPMW	6,30
Vinho Affinity+OPTIRED	6,50
Vinho Affinity+OPMWcontrolo	6,40
Vinho Affinity+OPMW+OPMW	6,45
Vinho Affinity+OPMW+OPTIRED	6,60

5.2. Análise dos iões nos vinhos espumantes

Os níveis de catiões na segunda fermentação foram determinados para avaliação do efeito compensatório da adição de dois produtos enológicos, o OPMW e o OPTIRED, nos níveis de catiões dos vinhos. Assim após o estudo do efeito da eletrodialise nos níveis de minerais como K, Mg, Mn, Fe, Cu, Ca, Na, Zn, Mo, Co, analisaram-se os mesmos catiões após a adição destes produtos aos vinhos espumantes prontos para engarrafamento após a segunda fermentação, com os aditivos enológicos.

Na Tabela 10 e 11, estão representadas as concentrações dos catiões após o tratamento por eletrodialise, e após a adição dos produtos enológicos aos vinhos espumantes.

Tabela 10 - Quantidade de cátions presentes nos vinhos com adição dos produtos enológicos OPMW e OPTIRED para o vinho Affinity, em que letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes para $p < 0,05$

	Vinho Affinity		
	Após ED	OPMW	OPTIRED
K (mg/L)	269 ± 40,4 ^a	327 ± 49,1 ^a	390 ± 58,5 ^a
Mg (mg/L)	32,9 ± 4,9 ^a	28,6 ± 4,3 ^a	20,3 ± 3,0 ^{a,b}
Mn (µg/L)	951 ± 142,7 ^a	837 ± 126,2 ^a	603 ± 90,5 ^{a,b}
Ca (mg/L)	69,1 ± 31,8 ^a	43,28 ± 6,5 ^b	29,81 ± 4,5 ^c
Cu (µg/L)	105,1 ± 15,8 ^a	217 ± 32,6 ^b	255 ± 38,3 ^b
Fe (µg/L)	538 ± 80,7 ^a	329 ± 49,4 ^b	253 ± 38,0 ^b
Zn (µg/L)	890 ± 133,5 ^a	839 ± 125,9 ^a	526 ± 78,9 ^b
Mo (µg/L)	<5	<5	<5
Co (µg/L)	2,24 ± 0,3 ^a	8,34 ± 1,3 ^b	4,76 ± 0,7 ^c
Na (mg/L)	14,2 ± 2,1 ^a	<4 ^b	6,7 ± 1,0 ^c

Para o vinho Affinity (Tabela 10), tanto a adição do produto OPMW como do produto OPTIRED aumentaram os níveis de cobre e cobalto. O cobre sofreu um aumento de 52% no vinho com adição de OPMW, passando de 105,1 µg/L, após eletrodialise, para 217 µg/L com a adição de produto, e de 59% no vinho e com adição do OPTIRED (105,1 µg/L, após eletrodialise, contra 255 µg/L com OPTIRED), sendo as diferenças estatisticamente significativas. O cobalto, que se encontrava no vinho a 2,14 µg/L, aumentou para 8,34 µg/L no ensaio com adição de OPMW (aumento de 74%) e para 4,76 µg/L no ensaio com adição de OPTIRED (aumento de 55%). Ainda, pelos resultados observados, as concentrações de magnésio, manganês, cálcio, ferro, zinco e sódio diminuíram. Estes decréscimos podem não estar relacionados com a adição dos produtos enológicos, sendo justificados pela possível precipitação destes iões durante o seu congelamento já que as amostras foram congeladas e armazenadas até à sua análise.

Tabela 11 - Representação da análise dos cátions com adição dos produtos enológicos OPMW e OPTIRED para o vinho Affinity+OPMW, em que letras diferentes representam $p < 0,05$.

	Vinho Affinity+OPMW		
	Após ED	OPMW	OPTIRED
K (mg/L)	221 ± 33,2 ^a	500 ± 75 ^b	419 ± 62,9 ^b
Mg (mg/L)	26,0 ± 3,9 ^a	43,5 ± 6,5 ^b	41,3 ± 6,2 ^b
Mn (µg/L)	1017 ± 152,6 ^a	1260 ± 189 ^a	1170 ± 175,5 ^a
Ca (mg/L)	48,1 ± 7,2 ^a	64,95 ± 9,7 ^a	60,44 ± 9,1 ^a
Cu (µg/L)	73,8 ± 11,1 ^a	140 ± 21 ^b	153 ± 23,0 ^b
Fe (µg/L)	386 ± 57,9 ^a	395 ± 59,3 ^a	382 ± 57,3 ^a
Zn (µg/L)	933 ± 140,0 ^a	1234 ± 185,1 ^a	1061 ± 159,2 ^a
Mo (µg/L)	<5	<5	<5
Co (µg/L)	2,52 ± 0,4 ^a	9,60 ± 1,4 ^b	5,26 ± 0,8 ^c
Na (mg/L)	13,7 ± 2,1 ^a	6,6 ± 1,0 ^b	22,1 ± 3,3 ^c

Para o vinho Affinity+OPMW, tanto a adição do produto OPMW como do produto OPTIRED aumentaram os níveis de potássio, magnésio, cobre e cobalto (Tabela 11).

As preparações comerciais de leveduras inativas são obtidas da levedura *S. cerevisiae* após inativação térmica, e são usadas para reagir com taninos e reduzir a adstringência dos vinhos, melhorando as características organoléticas do vinho prevenindo oxidações nos vinhos brancos e servindo também como nutrientes para as leveduras. A sua composição é variável mas na sua maioria constam metabolitos resultantes da autólise das leveduras (aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, ácidos gordos), paredes das leveduras, vitaminas e minerais. (56–58)

No caso da adição dos produtos enológicos, o OptimumWhite e o OptiRed, conclui-se que ambos suplementam o meio para a levedura em alguns minerais sendo que no vinho Affinity, houve uma suplementação de cobre e cobalto e no vinho Affinity+OPMW a suplementação foi de potássio, magnésio, cobre e cobalto.

5.3. Análise sensorial

Na prova organolética avaliaram-se todos os ensaios realizados, em parâmetros como cor, aroma, sabor, e caracterizou-se a espuma. As variedades avaliadas foram:

- a) Vinho Affinity controlo
- b) Vinho Affinity+OPMW
- c) Vinho Affinity+OPTIRED
- d) Vinho Affinity+OPMW controlo
- e) Vinho Affinity+OPMW+OPMW
- f) Vinho Affinity+OPMW+OPTIRED

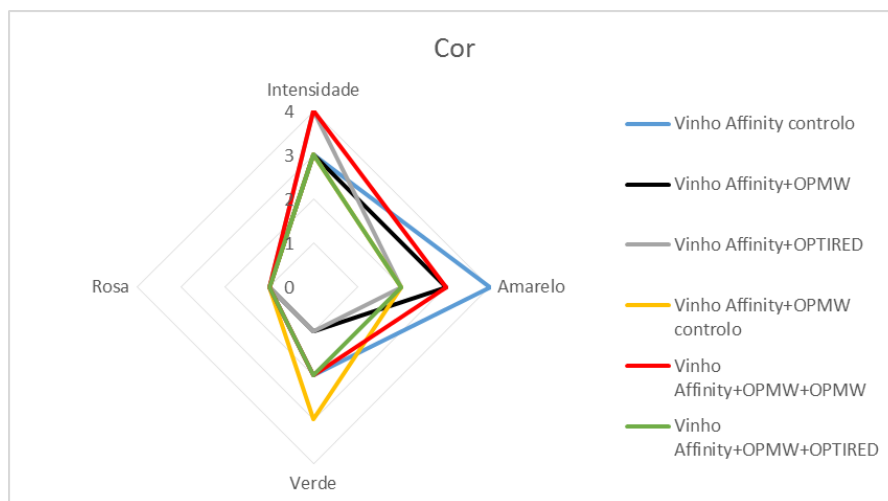


Figura 30 - Resultados do parâmetro “cor” da prova organolética.

A análise sensorial mostrou que a adição dos produtos OPMW e OPTIRED diminuiu a tonalidade amarela em todos os vinhos, por comparação com o vinho controlo, tendendo mais para o verde, tornando a cor dos vinhos mais intensa. O vinho controlo Affinity sem adição de qualquer produto enológico, é o vinho mais amarelo.

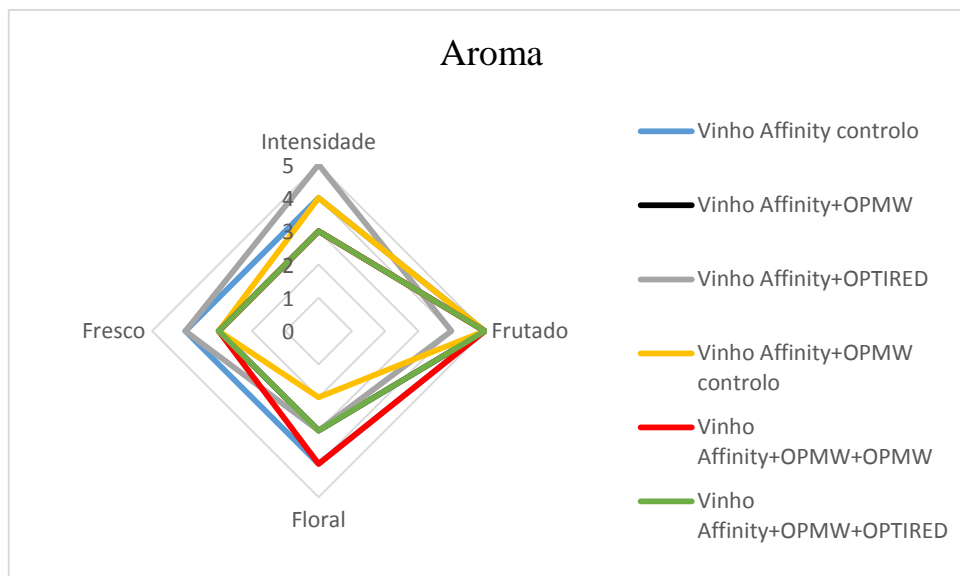


Figura 31 - Resultados do parâmetro “aroma” da prova organolética.

Quanto ao aroma, os vinhos são considerados todos intensos. Ainda os vinhos com adição de OPMW foram considerados os mais frutados. Esta observação justifica-se pelo facto do produto OPMW conservar os tióis do vinho, como os 4-mercapto-4metilpentan-2-ona e o 3-mercaptohexanol, sendo estes compostos voláteis os responsáveis pelo aroma frutado do vinho. (59)

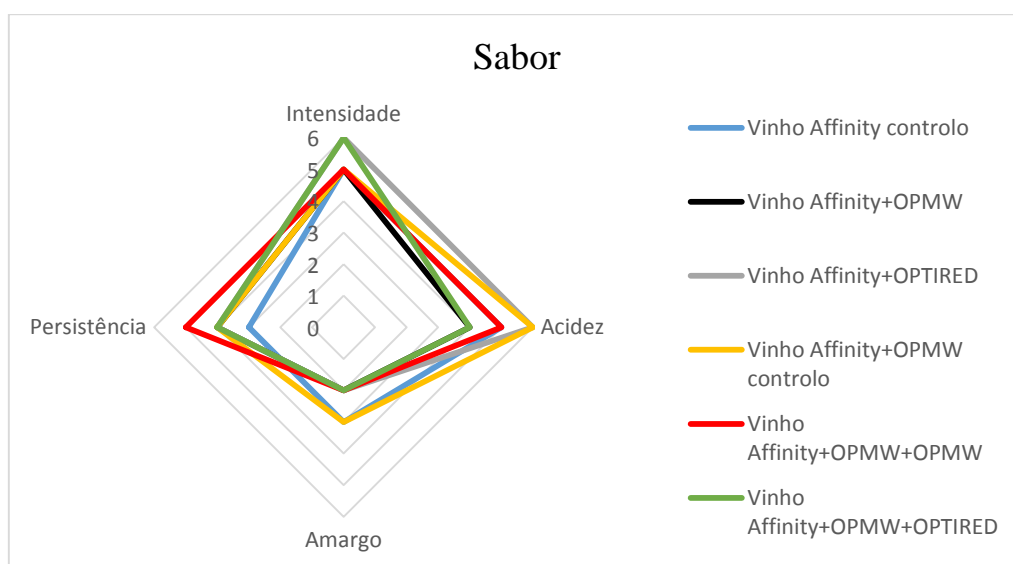


Figura 32 - Resultados do parâmetro “sabor” da prova organolética.

Quanto ao sabor, os vinhos com adição do OPTIRED foram considerados os mais intensos. Observou-se também que a adição dos produtos enológicos tornou o vinho mais encorpado e menos amargo e ácido. Os vinhos mais ácidos são precisamente os controlos de ambos os vinhos.

Tabela 12 - Parâmetros avaliados na caracterização da espuma.

<i>Amostras</i>	A controlo	A + opmw	A+ optired	B controlo	B+ opmw	B+ optired
<i>Quantidade</i>						
<i>Abundante</i>	1	6	8	4	8	7
<i>Normal</i>	3	4	2	0	3	3
<i>Escassa</i>	7	1	0	7	0	1
<i>Estabilidade</i>						
<i>Persistente</i>	5	7	8	4	8	9
<i>Momentânea</i>	6	4	3	7	3	2
<i>Efervescência</i>						
<i>Rápida</i>	9	2	7	0	3	3
<i>Normal</i>	2	8	2	3	7	6
<i>Lenta</i>	0	1	2	8	1	2

Quanto à espuma, a adição de qualquer um dos produtos enológicos aumentou o potencial da espuma. Tornou-a mais abundante e mais persistente, quando em comparação com os controlos. Em relação à efervescência não se observou grande influência dos produtos enológicos.

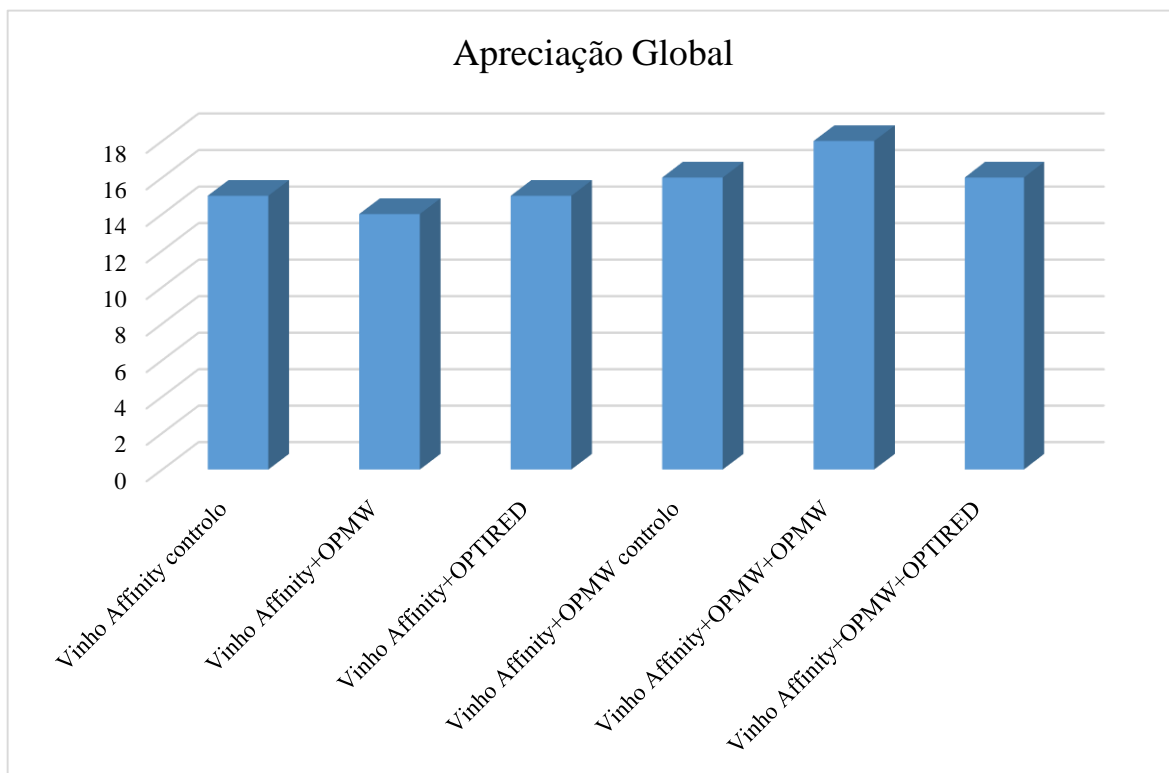


Figura 33 - Apreciação global dos vinhos em prova.

A apreciação global dos vinhos, através de uma escala de 0-20, mostrou que o vinho com pontuação mais elevada foi o vinho Affinity+OPMW em todos os seus ensaios.

V. Conclusão

V. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que acerca do impacto da eletrodialise nos parâmetros enológicos nos vinhos base para espumante. Em relação ao pH verifica-se diminuição de pH na ordem das 0,2 unidades, ainda assim inferior à redução máxima permitida por lei; a acidez total sofre uma diminuição ligeira concordante com a descida de pH; o extrato seco também sofre uma diminuição relacionada com a diminuição do teor de ácido tartárico e minerais retirados durante o tratamento por eletrodialise. Quanto ao teor em compostos fenólicos, há uma diminuição deste valor ao longo do tempo pela precipitação natural destas moléculas, contudo a eletrodialise não afeta o vinho neste parâmetro, assim como a atividade antioxidante. O tratamento por eletrodialise diminuiu significativamente as concentrações de alguns catiões, como magnésio, manganês, zinco e cobalto. Quanto ao teor do ião potássio nos vinhos, na determinação da Aliança, há uma diminuição nos níveis deste catião já que este processo retira essencialmente potássio no vinho, sendo a sua taxa de remoção coerente com a taxa de tratamento determinada para obter estabilidade tartárica nos vinhos. Quanto ao teor em potássio determinado no LCA, as quantidades já se encontravam baixas mesmo antes do tratamento por eletrodialise e não se observa variação. Justifica-se esta discrepância de valores em relação às determinações na Aliança, pelo facto das amostras terem sido congeladas e armazenadas cerca de 3 meses até à sua análise, havendo a eventual precipitação de iões potássio. Quanto ao tratamento por eletrodialise, diminuiu os níveis de cálcio, pois a eletrodialise é um processo usado na remoção destes iões que tendem a formar precipitados no vinho, sendo os valores determinados na Aliança, coerentes com as análises do LCA. Iões como sódio, ferro e cobre não variam significativamente com a eletrodialise. Após eletrodialise, por comparação ainda dos níveis de catiões dos vinhos base em estudo, com os valores de referencia para as concentrações necessárias para o crescimento celular e reprodução das *S.cerevisiae*, conclui-se que minerais como potássio, manganês, cálcio, ferro e zinco encontram-se em concentrações superiores às dos valores de referencia para a realização da segunda fermentação em garrafa. Iões como magnésio, molibdénio e cobalto não se encontravam na concentração adequada para o crescimento celular da levedura.

Assim, tendo em conta que se produziram dois vinhos base, o vinho Affinity sem adição de produto enológico, e o vinho Affinity+OPMW, com adição de produto enológico,

Conclusão

conclui-se que após o tratamento por eletrodialise, o vinho Affinity demonstra ter níveis mais elevados de cálcio, cobre e ferro em relação ao vinho Affinity+OPMW. Conclui-se ainda que o produto enológico não tem qualquer influência nos níveis minerais dos vinhos base para espumante. A sua adição no início de fermentação não melhora os níveis dos cátions analisados.

Quanto à avaliação da adição dos produtos enológicos OPMW e OPTIRED ao vinho antes da segunda fermentação, como suplementos após eletrodialise, observou-se que no caso vinho Affinity, houve uma suplementação de cobre e cobalto. Ainda as concentrações de magnésio, manganês, cálcio, ferro, zinco e sódio diminuíram. Estes decréscimos podem não estar relacionados com a adição dos produtos enológicos, sendo justificados pela possível precipitação destes íons durante o seu congelamento. No vinho Affinity+OPMW a suplementação foi de potássio, magnésio, cobre e cobalto, podendo-se justificar este aumento pela presença de uma certa quantidade destes íons nos produtos enológicos adicionados.

A análise sensorial dos vinhos mostrou que a adição dos produtos OPMW e OPTIRED diminuiu os amarelos, tornando-os mais verdes, quanto ao aroma, os vinhos são considerados todos intensos, e os vinhos com adição de OPMW foram considerados os mais frutados, já que este produto preserva os compostos voláteis responsáveis pelo aroma frutado; quanto ao sabor, os vinhos com adição do OPTIRED foram considerados os mais intensos e a adição dos produtos enológicos tornou o vinho mais encorpado e menos amargo e ácido. A adição de qualquer um dos produtos enológicos aumentou o potencial da espuma, tornando-a mais abundante e mais persistente. A apreciação global dos vinhos mostrou que o vinho Affinity+OPMW+OPMW teve uma pontuação mais elevada.

Assim este estudo demonstrou que a adição de produto enológico OPMW ao vinho base para espumante não aumenta os níveis de cátions analisados, não sendo a sua adição necessária para o bom desempenho da levedura na etapa de 2ª fermentação em garrafa. As novas adições de OPMW e OPTIRED no vinho base na segunda fermentação, apesar de aumentarem níveis de cátions como potássio, magnésio, cobre e cobalto, não têm qualquer influência na fermentação, sendo a sua adição apenas interessante com vista a modificar as características organolépticas do vinho.

É de referir ainda, que de acordo com a literatura, no que refere as concentrações de íons requeridas para o crescimento celular das leveduras *S.cerevisiae*, cátions como

magnésio, molibdênio e cobalto encontravam-se em concentração inferior ao intervalo de referência, contudo, não houve qualquer implicação na segunda fermentação em garrafa. Estes resultados são respetivos a esta levedura, para se concluir mais acerca destes produtos enológicos seriam necessários estudos extra com outras leveduras fermentativas e ainda com outras uvas.

VI. Bibliografia

VI. Bibliografia

1. Pierre J, Marilde T. Vinhos espumantes: métodos de elaboração. *Evidência*. 2013;13(1):65–77.
2. Caliari V, Pretto C, Pierre J, Bordignon-luiz MT. Food Science and Technology Effect of the Traditional , Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. *Food Sci Technol*. 2015;61(2):393–400.
3. Infovini. Conhecer regiões: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php>, consultado em 23-05-2015.
4. Enoteca. Castelão: <http://www.enoteca.pt/content/castelao>, consultado em 24-05-2015.
5. Kemp B, Alexandre H, Robillard B, Marchal R. Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *J Agric Food Chem*. 2015;63:19–38.
6. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd ed. England: John Wiley & Sons, 2006; 1-497.
7. Cros S, Lignot B, Bourseau P, Jaouen P, Prost C. Desalination of mussel cooking juices by electro dialysis: effect on the aroma profile. *J Food Eng*. 2005;69:425–36.
8. Bories A, Sire Y, Bouissou D, Goulesque S, Moutounet M, Bonneaud D, Lutin F, Rouge P. Environmental Impacts of Tartaric Stabilisation Processes for Wines using Electrodialysis and Cold Treatment. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 2011;32(2):174–82.
9. Pérez-Serradilla JA, de Castro MDL. Role of lees in wine production: A review. *Food Chem*. 2008;111:447–56.
10. Alexandre H, Guilloux-benatier M. Yeast autolysis in sparkling wine. *Aust J Grape Wine Res*. 2006;12:119–27.
11. Fallis C, Sommelier M. Champagne & Sparkling Wine: grape goddess guides to good living. Lincoln, E.U.A.: iUniverse; 2004. 1-98 p.
12. Coelho E. Relação do aroma e da espuma dos vinhos espumantes com o potencial enológico das uvas e dos vinhos. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor em Química. Aveiro, Portugal. 2010;1–192.
13. Clarke RJ, Bakker J. Wine flavour chemistry. United Kingdom: Blackwell publishing, 2004;339.

Bibliografia

14. Yolanda PN, Alfonso VC, Ramón G, María CP, Adolfo JM-R. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *J Agric Food Chem.* 2005;53:7232-7.
15. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiol.* 2004;21(4):377-97.
16. Silva S, Ramon-Portugal F, Silva P, Teixeira MF, Strehaiano P. Use of encapsulated yeast for the treatment of stuck and sluggish fermentations. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 2002;36:161-8.
17. Hilge-Rotmann B, Rehm H-J. Comparison of fermentation properties and specific enzyme activities of free and calcium-alginate-entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990;33(1):54-8.
18. Buzás Z, Dallmann K, Szajáni B. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol Bioeng.* 1989;34(6):882-4.
19. Najafpour G, Younesi H, Ku Ismail KS. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 2004;92(3):251-60.
20. Alexandre H, Charpentier C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998;20(1):20-7.
21. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd ed. England: John Wiley & Sons, 2006; 1-497.
22. Walker GM, Maynard AI. Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzym Microb Technol.* 1996;18:455-9.
23. Walker GM. Yeast physiology and biotechnology. 1st ed. Chichester, England: Wiley; 1998. 1-362.
24. Plášek J, Gášková D, Ludwig J, Höfer M. Early changes in membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae* induced by varying extracellular K(+), Na (+) or H (+) concentrations. *J Bioenerg Biomembr.* 2013;45(6):561-8.
25. Rodríguez-Navarroso A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1469:1-30.
26. Nabais RC, Correia ISA, Viegas CA, Novais JM. Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Appl Env Microbiol.* 1988;54(10):2439-46.

27. Eide DJ. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:441–69.
28. Stehlik-tomas V, Zeti VG, Stanzer D, Grba S. Zinc , Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food technol biotechnol.* 2004;42(2):115–20.
29. Askwith CC, Silva D. Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microb.* 1996;20(1):27–34.
30. Blackwell KJ, Tobin JM, Avery S V. Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;47(2):180–4.
31. Oliveira A, Barros P, Carvalho N. Estudo analítico de vinhos portugueses por electroforese capilar. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto. Porto, Portugal. 2008;1-15.
32. Cameira dos Santos P, Pereira OM, Gonçalves F, Simões JT, Pinho MN. Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: estudo comparativo da electrodiálise e de um método tradicional. *Ciência Téc Vitiv.* 2000;15(2):95–108.
33. Low LL. Evaluation of tartrate stabilization technologies for wine industry. University of Adelaide, Australia; 2007; 1-180.
34. Zoecklein B. A review of potassium bitartrate stabilization of wines. *Virginia Polytech Inst State Univ Publ.* 1988;463(13):1–6.
35. Gonçalves F, Cameira dos Santos P, Fernandes C, Pinho M. Wine tartaric stabilization by electrodialysis and its assessment by the saturation temperature. *J Food Eng.* 2003;59:229–35.
36. Nunes M. A electrodiálise na estabilidade tartárica dos vinhos: comparação com o método clássico. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Viticultura e Enologia. Lisboa, Portugal. 2011;1-106.
37. Lasanta C, Gómez J. Tartrate stabilization of wines. *Trends Food Sci Technol.* 2012;28(1):52–9.
38. La P, Tartrique S, Vins DES. Use of ion exchange resins for tartrate wine stabilization. *J Int Sci Vigne Vin.* 2006;40(4):223–46.
39. Lasanta C, Caro I, Pérez L. The influence of cation exchange treatment on the final characteristics of red wines. *Food Chem.* 2013;138(2-3):1072–8.

Bibliografia

40. Hubicki Z, Geca M, Kołodyńska D. The effect of the presence of metatartaric acid on removal effectiveness of heavy metal ions on chelating ion exchangers. *Environ Technol.* 2011;32:805–16.
41. Guise R, Filipe-Ribeiro L, Nascimento D, Bessa O, Nunes FM, Cosme F. Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chem.* 2014;156:250–7.
42. Moine-Ledoux, V; Dubourdiou D. Rôle des mannoprotéines de levures vis-à-vis de la stabilisation tartrique des vins. *Bull L'OIV.* 2002;75:857–8.
43. Moutonet M, Bouissou D, Escudier J-L. Détermination du degré d'instabilité tartrique (DIT), principes et applications. *Rev Française d'Oenologie.* 2010;242:24–8.
44. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231–7.
45. Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2013;104:366–71.
46. Romanov AM, Zelentsov VI. Use of electro dialysis for the production of grape-based soft and alcoholic drinks. *Surf Eng Appl Electrochem.* 2007;43(4):279–86.
47. Gómez-Benítez J, Palacios MV, Szekely GP, Veas LR, Pérez RL. Comparison of electro dialysis and cold treatment on an industrial scale for tartrate stabilization of sherry wines. *J Food Eng.* 2003;58(4):373–8.
48. Moreno-Arribas, M. Victoria CM. Wine chemistry and biochemistry. 1st ed. Madrid, Espanha: Springer; 2009. 425-441.
49. Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl Environ Microbiol.* 1984;48(5):1034–8.
50. Romano P, Suzzi G. Wine microbiology and biotechnology. Fleet GH, editor. Chur, Suíça: Harwood Academic Publishers; 1993. 373-393.
51. Siebert K, Troukhanova N V, Lynn PY. Nature of polyphenol-protein interactions. *J Agric Food Chem.* 1996;44:80–5.
52. Freitas J De, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C. Yeast , a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals.* 2003;16:185–97.

53. Blackwell KJ, Tobin JM, Avery SV. Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;49(6):751–7.
54. Maisonnave P, Sanchez I, Moine V, Dequin S, Galeote V. Stuck fermentation: Development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(2-3):239–47.
55. Sauvignon C. Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(2):184–9.
56. Ángeles M, Andújar-Ortiz I, Moreno-Arribas MV. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Res Int.* 2009;42(7):754–61.
57. Borrull A, Poblet M, Rozès N. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiol.* 2015;48:41–8.
58. Charpentier C. Ageing on lees (sur lies) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation. In *Managing Wine Quality*, Mark Reynolds (ed.). Woodhead Publishing; 2010. p.164-187.
59. Pérez-Serradilla JA, Castro MD. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chem.* 2011;124(4):1652–9.

VII. Anexos

Anexo 1 - Ficha de prova de vinhos espumantes.



Ficha de Prova – Análise Sensorial de Vinhos Espumantes

Provedor _____ Data _____

Classifique os atributos Cor, Aroma e Gosto numa escala de 1 a 6 da seguinte forma:

Cor: 1 – Sem Cor 2 – Ligeira 3 – Pouco Intensa 4 – Intensa 5 – Bastante Intensa 6 – Muito Intensa

Aroma: 1 – Sem Aroma 2 – Pouco Perceptível 3 – Pouco Intenso 4 – Intenso 5 – Bastante Intenso 6 – Muito Intenso

Gosto: 1 – Inexistente 2 – Pouco Perceptível 3 – Pouco Intenso 4 – Intenso 5 – Bastante Intenso 6 – Muito Intenso

		Vinhos espumantes					
		mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra
Cor	Inten sidade						
	Amar elo						
	Verd e						
	Rosa						
Aroma	Inten sidade						
	Fruta do						
	Flora l						
	Fresc o						
Gosto	Inten sidade						

	Acid ez						
	Amar go						
	Persi stência						

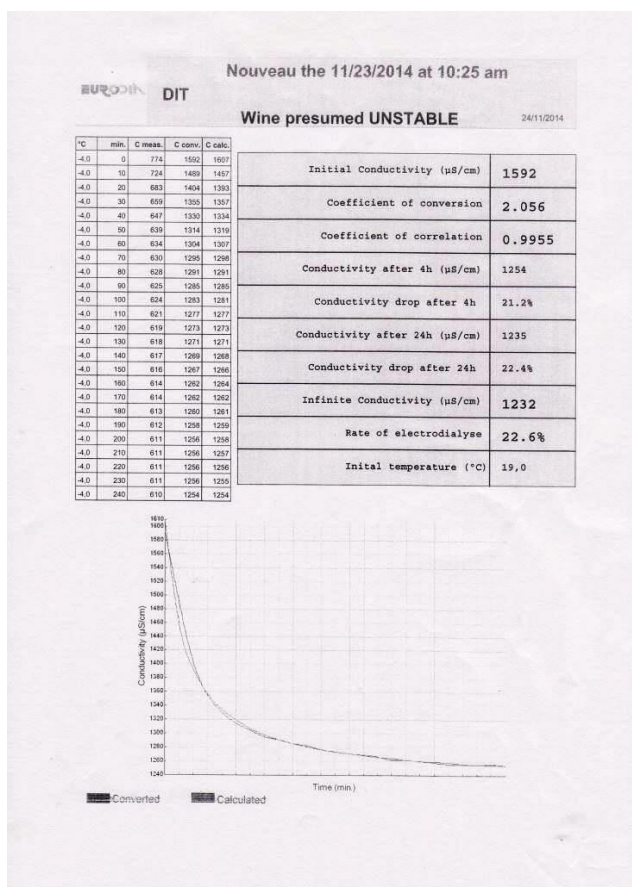
Classifique os atributos da espuma: quantidade, estabilidade e efervescência, selecionando com um x no adjetivo que melhor caracteriza:

Adje tivo		Vinhos espumantes					
		A mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra
Qua ntidade	Abu ndante						
	Nor mal						
	Esca ssa						
Esta bilidade da espuma	Pers istente						
	Mo mentânea						
Efer vescência	Rápi da						
	Nor mal						
	Lent a						

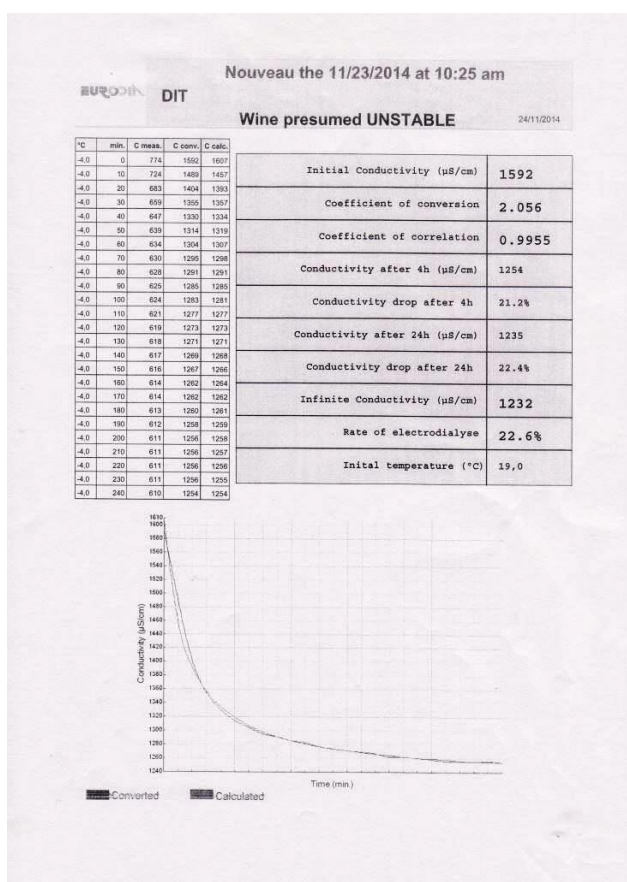
Apreciação Global: Escala de hedônica de 0 a 20

Apre ciação Global	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra	A mostra

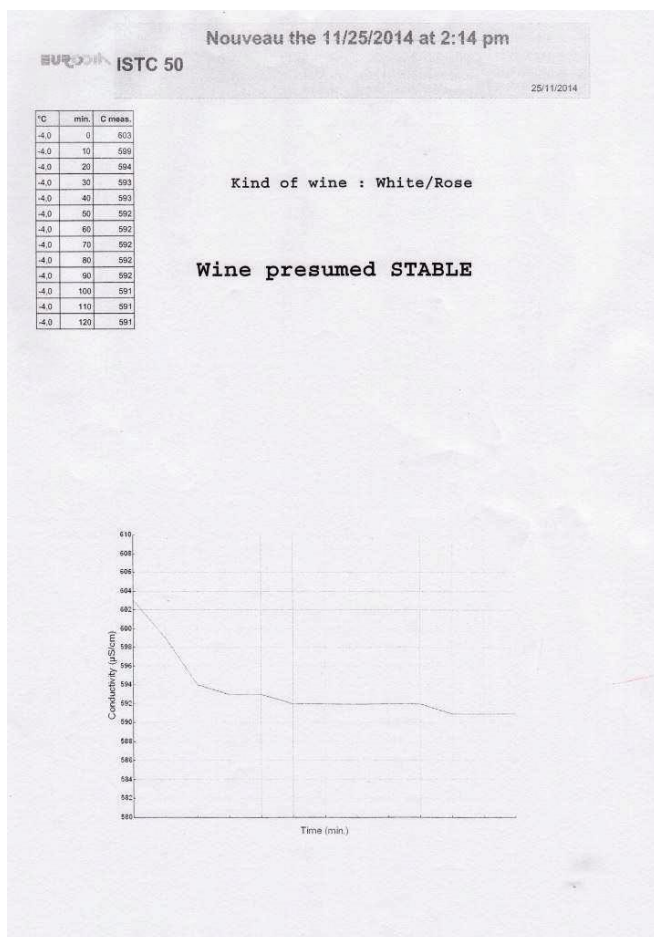
Anexo 2: Teste D.I.T para o vinho Affinity



Anexo 3: Teste D.I.T para o vinho Affinity+OPMW.



Anexo 4: teste ISTC50 para vinho Affinity.



Anexo 5: teste ISTC50 para vinho Affinity+OPMW.

