

Inibidores da precipitação de tartarato de cálcio em vinhos

Maria de Fátima Gonçalves Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores:

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina Fernandes (IST)

Co-Orientadores: Professor Doutor Vítor Geraldês (IST)

Doutora Sofia Catarino (INIAV, Dois Portos)

Presidente: Professor Doutor Sebastião Alves (IST)

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina Fernandes (IST)

Vogais: Professor Doutor Licínio Ferreira (IST)

Dezembro 2014

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição das pessoas que agora enumero. A todas elas um muito obrigada!

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Fernandes, pelo apoio, dedicação, conhecimentos transmitidos, disponibilidade e interesse demonstrado desde o início até ao fim deste trabalho. Agradeço o esforço incansável em garantir a existência de todas as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Vítor Geraldês pelos conselhos e conhecimentos transmitidos relativamente a aspectos técnicos relacionados com a operação e funcionamento do processo com membranas utilizado no presente trabalho.

À Doutora Sofia Catarino gostaria de agradecer os conhecimentos transmitidos na área do vinho e por ter possibilitado o acesso a bibliografia que se revelou de grande importância na realização deste trabalho. Gostaria também de agradecer as facilidades proporcionadas ao nível das deslocações, durante o período em que estive no INIAV.

Ao INIAV por me ter proporcionado a oportunidade de ter contacto com algumas das técnicas utilizadas na caracterização físico-química do vinho, assim com também, por ter fornecido o vinho tinto usado neste trabalho.

À Professora Doutora Maria Norberta de Pinho pelo interesse demonstrado no presente trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e por ter proporcionado o acesso a bibliografia de interesse.

À Professora Doutora Fátima Farelo pela disponibilidade e apoio demonstrados e por ter proporcionado meios indispensáveis à realização de certas etapas experimentais do presente trabalho.

Ao professor Doutor António Conceição pelo empréstimo do eléctrodo selectivo aos iões de cálcio, indispensável à realização dos ensaios de precipitação.

Aos professores Doutores: Joana Neiva e Jorge Carvalho por terem possibilitado a utilização da centrífuga.

Ao professor Doutor Manuel Francisco Pereira pela disponibilidade demonstrada na realização das análises por difracção de raios X para algumas das amostras obtidas nos ensaios de precipitação.

À Engenheira Sofia Figueiredo pelo fornecimento de informação importante relativa à operação e ao funcionamento do COT.

Aos meus pais e à minha irmã agradeço o carinho, a paciência, a motivação e o apoio demonstrado nos momentos mais difíceis ao longo de toda esta jornada. À minha irmã um agradecimento especial pela amizade, pelos conselhos e por ter sempre a palavra certa no momento certo!

“If you can imagine it
you can achieve it
If you can dream it
you can become it”

William Arthur Ward

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Resumo

O objectivo do presente trabalho experimental foi avaliar a influência de diferentes compostos, na sua maioria compostos que integram a constituição do vinho, na precipitação do tartarato de cálcio (CaT). Entre os compostos que constituem o vinho testaram-se diferentes classes de compostos comerciais (ácidos orgânicos; ácidos fenólicos; aminoácidos, entre outros) e outros que foram isolados do vinho tinto por recurso à ultrafiltração.

Os ensaios de ultrafiltração foram realizados na instalação LabUnit M20 (da DSS) e conduziram à obtenção de diferentes fracções de polissacáridos a partir do vinho tinto. Estes ensaios foram realizados com as membranas FS40PP e FS61PP, em modo de concentração e à pressão de 3 bar. Com a membrana FS40PP obtiveram-se concentrados ricos nos polissacáridos de maior peso molecular (arabinogalactanoproteínas e manoproteínas), a diferentes factores de concentração volumétricos (1.5; 2; 3; 4 e 4.5). Com a membrana FS61PP obteve-se um permeado rico nos polissacáridos de menor peso molecular (ramnogalacturonanas).

Os polissacáridos existentes nos permeados e concentrados, resultantes dos ensaios de ultrafiltração com as duas membranas, foram precipitados com etanol e utilizados, posteriormente, nos ensaios de precipitação.

Os compostos a testar foram adicionados a uma solução modelo hidroalcoólica a 15°C. Os tempos de indução associados à precipitação do tartarato de cálcio foram avaliados visualmente e com recurso a um eléctrodo selectivo aos iões de cálcio, tendo-se verificado que o início da turvação da solução coincidiu com uma alteração na resposta do eléctrodo.

Dois dos ácidos orgânicos estudados, os ácidos cítrico e málico, demonstraram ser responsáveis por um maior atraso no tempo de indução. Estes ácidos quando adicionados à mesma concentração molar (0,02 M) demonstraram a seguinte ordem de inibição: ácido málico > ácido cítrico. O ácido glucónico revelou ser, às concentrações testadas, um inibidor eficiente da precipitação do tartarato de cálcio, dado que durante o período em que decorreram os ensaios com este composto (cerca de 2 h) não ocorreu precipitação. O ácido metartartárico, aditivo usado na indústria vitivinícola para prevenir as precipitações tartáricas, também demonstrou evitar a ocorrência de precipitação, tal como seria expectável.

Os polissacáridos isolados a partir das fracções obtidas por ultrafiltração revelaram, no geral, não influenciar significativamente os tempos de indução. A influência mais notória ocorreu aquando da adição dos precipitados polissacáridos com factores de concentração volumétricos (FCV) de 4 e 4.5. O teor de polissacáridos obtidos para estas fracções demonstraram ser superiores face aos precipitados obtidos com outros FCV.

Palavras chave: Tartarato de cálcio; Precipitação; Vinho Tinto; Ultrafiltração; Inibidores.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Abstract

The aim of the present experimental study was to evaluate the influence of different compounds, in its majority those which are part of the wine composition, on the precipitation of the calcium tartrate (CaT). Within the compounds that are part of the wine composition, different categories of marketed compounds (organic acids; phenolic acids; amino acids, among others) and others that were isolated from the red wine by ultrafiltration, were tested.

The ultrafiltration assays were carried out in the equipment LabUnit M20 (from DSS) and different polysaccharide fractions were obtained from the red wine. These assays were performed with the FS40PP and FS61PP membranes, under the concentration mode, at a pressure of 3 bar. When the FS40PP membrane was used, concentrates rich in polysaccharides of higher molecular weight (arabinogalactan proteins and mannoproteins), at different volumetric concentration factors (1.5, 2, 3, 4 and 4.5), were obtained. When using the FS61PP membrane, a permeate rich in polysaccharides of lower molecular weight (rhamnogalacturonan) was obtained.

The polysaccharides presented in both permeates and concentrates, obtained from the ultrafiltration assays conducted with the two membranes, were precipitated with ethanol, followed by its use in the precipitation assays.

The compounds to be tested were added to a hydroalcoholic standard solution, at 15 °C. The induction periods associated with the calcium tartrate precipitation were either evaluated through its visual appearance and also with the use of a calcium ion-selective electrode. It was observed that at the time the solution began to be cloudy there was a change in the electrode's response.

Two of the organic acids studied, the citric and malic acids, have demonstrated to be responsible for a higher delay in the induction time. These acids when added at the same molar concentration (0.02 M) have shown the following inhibition strength: malic acid > citric acid. The gluconic acid has demonstrated, at the studied concentrations, to be an efficient inhibitor of the calcium tartrate precipitation, since that within the period in which the assays were conducted with this compound (approximately 2 hours), the precipitation did not occur. Metatartaric acid, an additive used in the wine industry to avoid the tartaric precipitations, has also demonstrated to prevent the occurrence of precipitation, such as it would be expected.

Overall, it was found that the polysaccharides isolated from the fractions obtained by ultrafiltration did not significantly influence the induction times. The most important influence has occurred when the polysaccharides precipitates with volumetric concentration factors (VCF) of 4 and 4.5 were added. The concentration of polysaccharides obtained for those fractions have shown to be higher when compared with the precipitates obtained with other VCF.

Key words: Calcium Tartrate; Precipitation; Red Wine; Ultrafiltration; Inhibitors.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice	vii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xiii
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Vinho.....	1
1.2. Processos de separação com membranas	2
1.3. Objectivos gerais	3
1.4. Estrutura da dissertação.....	3
2. Enquadramento teórico	5
2.1. Constituição do vinho	5
2.1.1. Constituição mineral	5
2.1.2. Constituição ácida	6
2.1.2.1. Principais ácidos orgânicos	6
2.1.3. Constituição azotada	7
2.1.4. Constituição fenólica	9
2.1.4.1. Compostos não flavonóides	9
2.1.4.2. Compostos flavonóides	10
2.1.5. Constituição polissacarídea.....	10
2.1.5.1. Polissacáridos de origem vegetal.....	11
2.1.5.2. Polissacáridos com origem em leveduras	13
3. Processos de separação com membranas.....	15
3.1. Modos de funcionamento dos processos de separação com membranas	15
3.2. Modos de operação dos processos de separação com membranas.....	16
3.3. Processos de separação com membranas controlados pela pressão.....	16
3.3.1 Ultrafiltração.....	17
3.3.2 Fenómeno de polarização da concentração e colmatção das membranas. Modelo das resistências em série e Modelo do filme.	18
4. Estabilidade Tartárica.....	21
4.1. Precipitações tartáricas	21
4.1.1. Bitartrato de potássio.....	22
4.1.2. Tartarato de cálcio.....	23
4.1.2.1. Processo de cristalização	23
4.1.2.2. Cinética de cristalização	24
4.1.2.3. Factores que afectam a precipitação do tartarato de cálcio.....	25

4.1.2.4.	Inibidores da precipitação do tartarato de cálcio presentes no vinho	26
5.	Tratamentos de estabilização tartárica	27
5.1.	Métodos Físicos	27
5.1.1.	Tratamento pelo frio	27
5.1.1.1.	Estabilização lenta sem adição de cristais	27
5.1.1.2.	Estabilização rápida com adição de cristais de KHT (Método de contacto)	27
5.1.2.	Electrodialise	28
5.1.3.	Nanofiltração e Microfiltração	29
5.1.4.	Permuta Iónica.....	29
5.2.	Métodos Químicos.....	30
6.	Parte Experimental.....	33
6.1.	Vinho.....	33
6.2.	Ultrafiltração.....	34
6.2.1.	Procedimento de funcionamento da instalação	35
6.3.	Membranas.....	36
6.3.1.	Lavagem das membranas	36
6.3.2.	Compactação das membranas.....	37
6.3.3.	Caracterização das membranas.....	37
6.3.3.1.	Determinação da permeabilidade hidráulica	37
6.3.3.2.	Determinação do limite de exclusão molecular das membranas (MWCO).....	37
6.3.4.	Ensaio de UF com o vinho tinto.....	38
6.3.4.1.	Ensaio em modo de concentração	38
6.4.	Métodos Analíticos	39
6.4.1.	Caracterização físico-química do vinho	39
6.4.2.	Determinação do carbono orgânico total (COT)	41
6.4.3.	Isolamento dos polissacáridos totais existentes no vinho e nas fracções obtidas por UF	41
6.4.4.	Determinação do teor de polissacáridos pelo método fenol-sulfúrico.....	41
6.5.	Ensaio de precipitação	42
7.	Resultados e Discussão.....	45
7.1.	Caracterização físico-química do vinho	45
7.2.	Caracterização das membranas.....	45
7.2.1.	Determinação da permeabilidade hidráulica	45
7.2.2.	Determinação do limite de exclusão molécula (MWCO).....	46
7.3.	Ensaio de UF com o vinho tinto.....	48
7.3.1.	Ensaio em modo de concentração com a membrana FS40PP conducentes à obtenção das fracções com diferentes FCV a usar nos ensaios de precipitação.	49
7.4.	Ensaio de UF com o permeado obtido pela membrana FS40PP	50

7.5.	Isolamento dos polissacáridos presentes no vinho tinto e nas fracções obtidas por UF com as membranas FS40PP e FS61PP. Determinação do teor de polissacáridos totais de cada uma das fracções.	51
7.6.	Ensaio de precipitação	53
7.6.1.	Avaliação da estabilidade tartárica de diferentes soluções modelo.....	53
7.6.2.	Efeito da temperatura na precipitação do CaT considerando a solução modelo a usar nos ensaios com aditivos	56
7.6.3.	Ensaio de precipitação para avaliar a influência de diferentes aditivos na precipitação do CaT	57
7.6.3.1.	Influência da adição de sementes de CaT na precipitação deste sal	60
7.6.3.2.	Influência da adição de diferentes aditivos comerciais na precipitação do CaT ...	61
7.6.3.2.1.	Ácidos orgânicos.....	61
7.6.3.2.2.	Ácidos fenólicos	68
7.6.3.2.3.	Açúcares	70
7.6.3.2.4.	Aminoácidos.....	74
7.6.3.2.5.	Outros compostos.....	76
7.6.4.	Ensaio de precipitação com os polissacáridos obtidos pelos ensaios de UF com o vinho tinto	78
8.	Conclusões.....	82
9.	Perspectivas de trabalho futuro	85
10.	Referências Bibliográficas.....	87
11.	Mediografia.....	91
12.	Anexos	93
	Anexo 1- Características das membranas de UF FS40PP e FS61PP	93
	Anexo 2- Resultados obtidos da Pesquisa Maloláctica por cromatografia em papel	94
	Anexo 3- Recta de calibração que relaciona a absorvância com a concentração de glucose (Método fenol-sulfúrico).....	95
	Anexo 4 – Representações gráficas	96
	Anexo 4A	96
	Anexo 4B	96
	Anexo 5- Evolução do potencial com o pH	100
	Anexo 6- Tabela resumo na qual constam as constantes de dissociação de cada aditivo considerado neste trabalho e a respectiva força iónica calculada.....	101
	Anexo 7 - Parâmetros m_1 e K'_G determinados para os ensaios de precipitação (sem e com aditivos)	102
	Anexo 8 - Imagens dos cristais obtidas, para alguns ensaios, por recurso a um microscópio óptico	104

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teores limites em que os compostos, que foram usados nos ensaios de precipitação, se encontram presentes no vinho (adaptado de Curvelo-Garcia, 1988).	8
Tabela 2. Massas moleculares dos principais polissacáridos e de alguns compostos fenólicos presentes no vinho.	14
Tabela 3. Características diferenciadoras dos processos de separação controlados pela pressão (Adaptado de Cheryan, 1998 e Mulder, 1996).....	16
Tabela 4. Solubilidade do bitartrato de potássio em água e numa solução aquosa de etanol a 20 °C (Ribéreau-Gayon, 2006).....	22
Tabela 5. Solutos de referência usados para a determinação do MWCO.	38
Tabela 6. Aditivos utilizados nos ensaios de precipitação e respectivas marcas.	44
Tabela 7. Caracterização físico-química do vinho tinto.	45
Tabela 8. Factores de rejeição obtidos experimentalmente para as duas membranas usadas no presente trabalho.....	47
Tabela 9. Volume de amostra utilizada no procedimento de precipitação com etanol, massa de precipitado obtida por este procedimento e massa de precipitado usada na determinação dos polissacáridos totais.	51
Tabela 10. Teor de polissacáridos totais no vinho tinto inicial, nos concentrados e nos permeados obtidos por UF.	52
Tabela 11. Tempos de indução obtidos e valores do PC calculados para cada uma das soluções modelo consideradas.	55
Tabela 12. Tempos de indução obtidos para as diferentes temperaturas e pH médio registado até ao início da precipitação.....	56
Tabela 13. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. ..	58
Tabela 14. Valores médios do declive do potencial em função do tempo (m_1) e da constante “cinética de crescimento” dos cristais (K_G), para os dois ensaios realizados com a solução modelo sem aditivo	59
Tabela 15. Efeito da adição de CaT no tempo de indução (TI), no decaimento do potencial em função do tempo (m_1) e na constante cinética de crescimento dos cristais (K_G)......	60
Tabela 16. Efeito dos ácidos orgânicos existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT	62
Tabela 17. Efeito de outros ácidos orgânicos no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT	67
Tabela 18. Efeito dos ácidos fenólicos existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT	69
Tabela 19. Efeito dos açúcares neutros existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT.....	70
Tabela 20. Efeito do ácido galacturónico no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT.....	72
Tabela 21. Efeito dos aminoácidos presentes no vinho, excepto a glicina, no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT.	74

Tabela 22. Efeito do fosfato no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT	76
Tabela 23. Efeito do ácido metatartárico no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT.	77
Tabela 24. Efeito dos polissacáridos obtidos a partir dos ensaios de UF com a membrana FS40PP (100 kDa) no tempo de indução (TI).	79
Tabela 25. Efeito das fracções obtidas por UF com a membrana FS61PP (20 kDa) no tempo de indução (TI).	81

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química dos ácidos benzóicos (à esquerda) e dos ácidos cinâmicos (à direita)	9
Figura 2. Estrutura hipotética da RG-II. A figura mostra as quatro cadeias glicosídicas laterais (A-D) na qual os resíduos estão numerados de acordo com a sequência modelo. (Pellerin <i>et al</i> , 1996)	13
Figura 3. Modos de funcionamento dos processo de separação com membranas. Representação esquemática da filtração convencional (à esquerda) e da filtração tangencial (à direita).	16
Figura 4. Representação da polarização de concentração e dos perfis de concentração da fase fluída (em estado estacionário).	19
Figura 5. Aspecto dos cristais de KHT (à esquerda) e CaT (à direita).	21
Figura 6. Curva de solubilidade do tartarato. (Smith, V., 2012)	22
Figura 7. Esquema de um empilhamento de ED (Cameira dos Santos, 2008)	28
Figura 8. Diagrama que esquematiza as principais etapas do procedimento experimental adoptado no presente trabalho.	33
Figura 9. Fotografia e esquema da instalação Lab-Unit M20.	34
Figura 10. Esquema de montagem das membranas no módulo de pratos planos (Instalação Lab-Unit M20).	35
Figura 11. Montagem experimental.	42
Figura 12. Representação do fluxo de permeação da água desionizada em função da pressão para as membranas: FS40PP (à esquerda) e FS61PP (à direita).	46
Figuras 13. a) Obtenção do limite de exclusão molecular para a membrana FS40PP (primeira figura); b. Obtenção do limite de exclusão molecular para a membrana FS61PP (segunda figura).	47
Figura 14. Variação do fluxo de permeação do vinho tinto com a pressão.	48
Figura 15. Variação do fluxo de permeação com o FCV, para a obtenção de concentrados de polissacáridos.	49
Figura 16. Variação do fluxo de permeação com o FCV.	50
Figura 17. Permeados e concentrados resultantes da UF, com as duas membranas, durante o procedimento de precipitação com etanol.	52
Figura 18. Gradação de cor das amostras durante a realização do método fenol-sulfúrico. Legenda: 1. Concentrado com FCV=1,5; 2. Concentrado com FCV=2; 3. Concentrado com FCV=3; 4. Concentrado com FCV= 4; 5. Concentrado com FCV= 4,5 e 6. Permeado com FCV= 4,5.	53
Figura 19. Representação gráfica do potencial (à esquerda) e da concentração de cálcio (à direita) em função do tempo.	58
Figura 20. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com a solução modelo com 2,3 g/L de ácido láctico.	63
Figura 21. Representações gráficas do potencial em função do tempo para os ensaios com adição de ácido cítrico e ácido málico a diferentes concentrações.	64
Figura 22. Representação gráfica do potencial em função do tempo para o ensaios com adição de 1g/L de ácido glucónico.	65

Figura 23. Representações gráficas do potencial em função do tempo para os ensaios com adição de 0,08 g/L de arabinose (à esquerda) e 0,4 g/L de arabinose (à direita).....	71
Figura 24. Representação gráfica do potencial em função do tempo para o ensaio com adição de 0,5 g/L de ácido galacturónico.....	73
Figura 25. Representação gráfica do potencial em função do tempo para o ensaio com adição de 1 g/L de ácido galacturónico.....	73
Figura 26. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com adição das fracções de concentrados obtidas pela membrana FS40PP (100 kDa) à solução modelo.....	80
Figura 27. Representação gráfica do teor de polissacáridos totais em função do FCV.	80
Figura 28. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com adição das fracções polissacarídicas, obtidas por UF com a membrana FS61PP (20 kDa), à solução modelo....	82

Abreviaturas

AGP- Arabinogalactanoproteínas

CaT- Tartarato de cálcio

CMC- Carboximetilcelulose

COT- Carbono orgânico total

ED- Electrodialise

FCV- Factor de concentração volumétrico

FI- Força iónica

INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

KHT- Hidrogenotartarato de potássio

MF- Microfiltração

MP- Manoproteínas

MWCO- Limite de exclusão molecular

NF- Nanofiltração

OI- Osmose Inversa

PC- Produto de concentração

RG (I e II)- Ramnogalacturonanas do tipo I e II

TI- Tempo de Indução

UF-Ultrafiltração

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

1. Introdução

1.1. Vinho

A produção e consumo do vinho remontam do início da civilização. O vinho é uma bebida resultante da fermentação alcoólica das uvas, por acção de leveduras que transformam os açúcares da uva (glucose e frutose) em etanol com libertação de dióxido de carbono. A composição do vinho é muito complexa devido à grande diversidade de espécies químicas presentes. Estas espécies provêm maioritariamente das uvas, sendo algumas delas produzidas pelas leveduras e outras introduzidas durante operações tecnológicas envolvidas na produção do vinho.

Segundo dados do FAOSTAT de 2012, a uva é das frutas que apresenta maiores produções. Em 2012, esta fruta registou uma produção, a nível mundial, de 67 milhões de toneladas, sendo que 39%, correspondente a 26 milhões de toneladas produzidas, foi utilizada na produção de vinho.

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse por parte do consumidor relativamente à qualidade do produto final. Por forma a dar resposta a este requisito, têm-se vindo a procurar novas tecnologias de produção que não interfiram com as características aromáticas e gustativas específicas de um vinho duma dada região, isto é, que não coloquem em causa a sua tipicidade. A tipicidade de um vinho pode ser a marca registada de uma região ou de uma variedade de uva, pelo que é importante respeitá-la.

A qualidade de um vinho não está apenas relacionada com as suas características organolépticas de aroma e gustação, mas também com a sua aparência visual. O que se pretende é que o produto final não apresente turvação e sólidos depositados ou em suspensão. Assim, após a fermentação o vinho é sujeito a clarificação, isto é, a um conjunto de operações unitárias que visam remover as espécies responsáveis pelo aspecto turvo (leveduras, sólidos em suspensão, etc). As tecnologias de vinificação usadas para assegurar a qualidade do vinho devem recorrer o mínimo possível a aditivos.

As precipitações tartáricas são fenómenos que ocorrem naturalmente no vinho, contudo se estas surgirem num vinho engarrafado são erroneamente associadas à falta de qualidade desse vinho. A presença de cristais, resultantes das precipitações tartáricas, no vinho não representa nenhum problema para a saúde, mas conduz a uma falta de confiança nesse vinho, por parte do consumidor. Assim, os vinhos antes de serem colocados no mercado devem ser estabilizados. Contudo, a estabilidade tartárica é difícil de alcançar devido ao grande teor de ácido tartárico presente na uva (Curvelo-Garcia, 1988). Em função das características físico-químicas e termodinâmicas do vinho, os sais resultantes da dissociação do ácido tartárico, nomeadamente o hidrogenotartarato de potássio (KHT) e, menos frequentemente, o tartarato neutro de cálcio (CaT), podem precipitar.

As precipitações tartáricas podem ser evitadas recorrendo a diferentes estratégias tecnológicas, que tanto visam, induzir a precipitação (tratamento pelo frio), como eliminar os iões em excesso (electrodialise, permuta iónica), ou ainda aumentar o nível de sobressaturação por adição de inibidores de precipitação (Claus, H. *et al*, 2014).

1.2. Processos de separação com membranas

A obtenção de um vinho de qualidade, sem recorrer a aditivos químicos, pode ser conseguida através de processos físicos que envolvem processos de separação com membranas, tais como a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e electrodiálise (ED).

Actualmente, os processos com membranas são muito usados nas várias etapas de processamento do vinho. A clarificação do vinho e a remoção de colóides e outras partículas que conferem ao vinho sabores secundários (*off-flavours*) característicos da sua origem, isto é, aromas da terra, é assegurada após a fermentação do mosto por processos de MF/UF. Após a clarificação, o vinho é estabilizado tartaricamente e microbiologicamente. A estabilização tartárica está associada à ED (de Pinho, M.N., 2010).

A indústria vitivinícola tem vindo a substituir os processos convencionais de filtração para clarificação pelos processos de separação com membranas acima referidos (MF e UF). Dos processos de filtração convencionais, o mais usual implica o recurso a adjuvantes de filtração, tais como, as terras de diatomáceas, perlite, celulose, entre outros. Os adjuvantes de filtração representam uma fonte de poluição, pelo que após utilização têm que ser devidamente tratados.

Os processos com membranas surgem assim como uma alternativa vantajosa pelo facto de serem processos automatizados, que operam em modo contínuo e não necessitam de recorrer a adjuvantes de filtração, o que os torna desta forma processos menos poluentes. O baixo consumo energético é outra das vantagens dos processos com membranas.

Dos processos de separação com membranas acima referidos, a ultrafiltração apresenta-se como sendo o processo mais indicado para o fraccionamento de macromoléculas, como os polissacáridos. A questão que se levanta na aplicação da UF à clarificação do vinho está relacionada com a falta de conhecimento relativa à importância que os polissacáridos e outras macromoléculas removidas desempenham na qualidade do vinho. Estas macromoléculas funcionam como colóides protectores e tem um papel importante na estabilidade tartárica, pelo que a sua remoção pode ser responsável por acelerar o processo de precipitação.

1.3. Objectivos gerais

Este trabalho tem como objectivo estudar qual a influência que determinados compostos desempenham na precipitação espontânea do tartarato de cálcio. Este estudo foi efectuado, por adição de diferentes aditivos, a uma solução hidroalcoólica que contém cálcio e ácido tartárico (solução modelo).

Numa primeira fase testaram-se compostos (comerciais) existentes no vinho e pertencentes a diferentes classes (ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, aminoácidos, açúcares, entre outros), bem como também compostos, que apesar de não fazerem parte da composição do vinho, apresentam características, referenciadas na literatura, que os tornam possíveis inibidores de interesse.

Numa segunda fase do trabalho, com vista a estudar a influência das macromoléculas (polissacáridos) do vinho no processo de precipitação do tartarato de cálcio, procedeu-se ao fraccionamento e isolamento destas.

O fraccionamento destas macromoléculas, do vinho tinto, foi feito por UF com recurso a duas membranas comerciais com limites de exclusão molecular (MWCO) de 100 kDa e de 20 kDa. O concentrado obtido após a passagem pela membrana de 100 kDa é rico nos polissacáridos do vinho de maior peso molecular, as arabinogalactanoproteínas (AGP) e as manoproteínas (MP), dado que ambas têm pesos moleculares superiores ao cut-off da membrana utilizada. O permeado obtido desta etapa, por sua vez, é alimentado à membrana de 20 kDa. O permeado resultante desta operação contém polissacáridos de baixo peso molecular, polifenóis e outros constituintes do vinho. Assim, nesta fracção espera-se que esteja presente a RG-II, dado que o peso molecular deste polissacárido se situa entre 5,8-10 kDa (Pellerin *et al*, 1996; Vernhet *et al*, 1999).

O isolamento dos polissacáridos presentes em cada uma das fracções obtidas por UF é conseguido por precipitação com etanol. Posteriormente, cada uma destas fracções é analisada quanto ao teor de polissacáridos totais, sendo por fim utilizadas nos ensaios de precipitação.

1.4. Estrutura da dissertação

Esta dissertação é composta essencialmente por cinco partes distintas. A primeira parte consiste numa introdução geral. Na segunda parte é feito um enquadramento do tema, com base na revisão bibliográfica que serve de base ao trabalho. A terceira e quarta parte dizem respeito ao trabalho experimental desenvolvido, e nestas estão incluídos, respectivamente, os procedimentos experimentais adoptados e os resultados obtidos.

Por fim, apresentam-se as conclusões retiradas e é dada uma perspectiva do trabalho que futuramente pode vir a ser realizado.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

2. Enquadramento teórico

2.1. Constituição do vinho

Um maior conhecimento da constituição do vinho, faz com que seja mais fácil entender os diversos fenómenos que nele ocorrem e com base nisso propor uma explicação e eventualmente encontrar uma solução para eles. É tendo isso em base que se apresenta uma descrição dos compostos existentes no vinho, a sua importância e a gama típica de concentrações em que se encontram presentes. A informação apresentada pretende assim servir de base ao estudo da influência que alguns destes compostos desempenham ao nível da estabilidade tartárica.

2.1.1. Constituição mineral

Os elementos minerais presentes nos vinhos representam 1,5 a 3 g/L no seu conjunto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982) e provêm na sua maioria da absorção radicular. Os elementos minerais no vinho podem caracterizar-se tendo em conta a quantidade em que se encontram presentes neste. Os componentes maioritários, tais como o Na, K, Mg e o Ca, estão presentes em concentrações de 10 mg/L até 1 g/L e correspondem a metais alcalinos e alcalino-terrosos (Catarino, S., 2006).

O K, Ca, Fe e Cu, estão relacionados com fenómenos de instabilidade físico-química dos vinhos, pelo que lhes é dada uma maior relevância no âmbito da química enológica.

Os elementos minerais encontram-se solubilizados no vinho, e no mosto, sob a forma de sais orgânicos (tartaratos, malatos, acetatos, entre outros), sais minerais (cloretos, sulfatos, fosfatos, etc.), formando também complexos orgânicos com outras espécies químicas (Catarino, S., 2006).

O enriquecimento dos vinhos em metais pode dar origem a fenómenos de turvações e a precipitações, que colocam em causa a qualidade destes.

Os metais mais leves, como o sódio, potássio, cálcio e magnésio estão presentes em quantidades significativas nas uvas. Pelo contrário metais pesados, como por exemplo o chumbo, encontram-se em quantidades vestigiais.

O potássio e o cálcio são os dois catiões mais representativos do vinho. Estes encontram-se, em parte salificados com o ácido tartárico e málico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

O potássio é o catião dominante nos vinhos, sendo a sua concentração nos vinhos geralmente superior a 0,78 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O potássio forma com o ácido tartárico, o hidrogenotartarato de potássio. Este sal é muito abundante no vinho e caracteriza-se por ser pouco solúvel ao pH deste. O teor de potássio é maior nos vinhos tintos do que nos brancos devido à inibição do hidrogenotartarato de potássio pelos compostos fenólicos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

O cálcio é um ião bivalente, pelo que é mais reactivo do que o potássio nas operações de floculação e precipitação de colóides. Este catião pode ser incorporado no vinho através de algumas operações unitárias. Desta forma, a concentração de cálcio presente no vinho, depende não só da concentração em que este está presente na uva, como também da concentração em que este é incorporado.

Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* 1977, existe um risco acrescido de ocorrência de depósitos tartáricos em garrafa, quando a concentração de cálcio é superior a 60 mg/L nos vinhos tintos e 80 mg/L nos vinhos brancos.

2.1.2. Constituição ácida

A constituição ácida representa uma das características químicas de grande importância nos vinhos, dado que condiciona a actividade microbiológica e determina quer as características organolépticas, quer a estabilidade físico-química destes (Curvelo-Garcia, 1988 ;Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Os ácidos que constituem o vinho têm origens diversificadas. Podem ser provenientes das uvas, resultantes da actividade de diferentes microorganismos, de processos químicos naturais que ocorrem durante as fases de evolução do vinho, ou resultar de processos tecnológicos (adição de correctivos ácidos) (Curvelo-Garcia, 1988).

2.1.2.1. Principais ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos constituintes dos vinhos desempenham uma função importante a nível da sua estabilidade. Assim, por exemplo vinhos brancos secos que não tenham sido sujeitos à fermentação maloláctica (processo que ocorre no vinho e durante o qual, o ácido málico é convertido em ácido láctico por acção de bactérias lácticas) são mais estáveis no que diz respeito às precipitações bitartáricas (KHT) e tartáricas (CaT).

Dos principais ácidos orgânicos presentes no vinho podem referir-se: o ácido tartárico, o ácido málico, o ácido cítrico e o ácido láctico.

- **Ácido tartárico**

O ácido tartárico é específico da uva, não estando muito difundido na natureza. É um ácido relativamente forte, conferindo ao vinho um pH de 3-3,5. A acidez conferida por este ácido funciona como um conservante do vinho, dado que garante a eliminação de certas bactérias indesejáveis. A concentração deste ácido nas uvas pode ser tão alta como 15g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Durante a maturação da uva e a fermentação alcoólica o seu teor no vinho diminui gradualmente, variando entre 1,5 a 4 g/L (Curvelo-Garcia, 1988). No vinho, o enantiómero presente é o L(+)-Tartárico.

- **Ácido málico**

O ácido málico encontra-se presente em todos os organismos vivos. O enantiómero presente no vinho é o L (-)-Málico. O teor deste ácido no vinho diminui devido a fenómenos de diluição e combustão, que ocorrem durante a fase de maturação. A ocorrência da fermentação maloláctica, conduz a uma desacidificação do vinho, o que confere ao ácido málico a grande importância que apresenta como factor de qualidade. Aquando da ocorrência da fermentação maloláctica, o teor em ácido málico pode ser reduzido para valores muito pequenos. O seu teor nos vinhos varia entre 0 a 4 g/L (Curvelo-Garcia, 1988).

- **Ácido cítrico**

O ácido cítrico provém das uvas e desempenha uma grande importância em enologia pelas características organolépticas próprias como o gosto ácido e as suas propriedades complexantes. O seu teor nos vinhos varia entre 0-0,5 g/L (Curvelo-Garcia, 1988). A adição de ácido cítrico ao vinho é autorizada em vários países e visa melhorar a acidez gustativa dos vinhos, assim como, em virtude das suas propriedades complexantes, funcionar como um agente bloqueador da casse férrica. O teor deste ácido não pode contudo ultrapassar 1g/L (Curvelo-Garcia, 1988).

- **Ácido láctico**

O teor de ácido láctico nos vinhos está dependente da ocorrência ou não da fermentação maloláctica. Assim, em vinhos onde não ocorreu a fermentação maloláctica, este ácido encontra-se presente sob a forma do enantiómero D(-)-ácido láctico, sendo a sua concentração muito pequena (0,5 g/L no máximo). Em vinhos onde ocorreu a fermentação maloláctica a concentração deste ácido atinge teores maiores que variam entre 0,1-3 g/L (Curvelo-Garcia, 1988; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). Neste caso o enantiómero maioritário, presente no vinho, é o L(+)-ácido láctico.

2.1.3. Constituição azotada

O azoto encontra-se presente no vinho sob a forma mineral e sob a forma orgânica.

O azoto mineral, encontra-se na forma de sais de amónia e atinge maiores concentrações (80%) nas células da película da uva durante a fase de crescimento vegetativo. O azoto amoniacal provém dos nitratos extraídos pelas raízes. Após o amadurecimento da uva, o teor em azoto mineral representa menos de 10% do azoto total (Ribéreau-Gayon, 2006) e encontra-se sob a forma do catião amónio (NH_4^+).

O azoto orgânico está presente no vinho e no mosto sob diversas formas (aminoácidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, amidas, aminas biogénicas, ácidos nucleicos, açúcares aaminados e pirazinas).

Os aminoácidos têm massas moleculares menores do que 200 Da. Estes representam, em peso, a fonte maioritária de azoto no sumo de uva e no vinho.

A forma mais importante de azoto no vinho diz respeito às proteínas. Estas macromoléculas têm massas moleculares compreendidas entre 9,6 e 60 kDa (Brissonnet *et al.*, 1993), sendo que a maioria delas apresenta uma massa molecular dentro da gama de 20-30 kDa (Brissonnet *et al.*, 1993). As proteínas consistem em cadeias ou sequências bem definidas de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. A sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica determina a estrutura tridimensional da proteína, isto é, a sua configuração espacial.

Certas proteínas aparecem associadas a fracções de açúcares, como é o caso das manoproteínas (consultar secção 2.1.5.2).

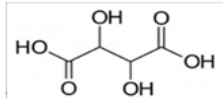
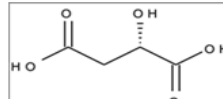
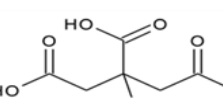
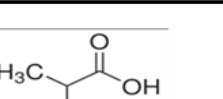
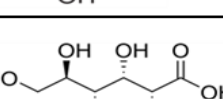
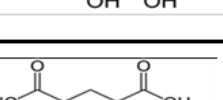
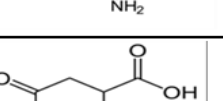
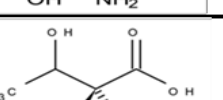
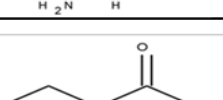
Podem existir no vinho proteínas instáveis, que ao precipitarem, dão origem ao que se conhece por casse proteica. Os problemas de casse proteica estão mais associados aos vinhos brancos, dado

que estes podem conter concentrações de proteínas até algumas centenas de mg/L. Os vinhos tintos não contêm quase nenhuma proteína livre, uma vez que estas são precipitadas pelos taninos (Ribéreau-Gayon, 2006).

A casse proteica afecta a claridade dos vinhos brancos e ocorre geralmente em vinhos engarrafados armazenados a altas temperaturas. As precipitações tartáricas e a floculação das proteínas são responsáveis pelos principais problemas relacionados com a claridade dos vinhos brancos engarrafados (Ribéreau-Gayon, 2006).

Na tabela 1 apresentam-se os teores limites de alguns compostos, que integram as diferentes constituições do vinho abordadas anteriormente. Os compostos apresentados foram os usados nos ensaios de precipitação (consultar secção 7.6).

Tabela 1. Teores limites em que os compostos, que foram usados nos ensaios de precipitação, se encontram presentes no vinho (adaptado de Curvelo-Garcia, 1988).

Classe do composto	Designação do composto	Fórmula	Teores limites (mg/L)
Ácidos orgânicos	L(+)- Ácido Tartárico		1500 – 4000
	L(-)- Ácido Málico		0 – 4000
	Ácido Cítrico		0 – 500
	L(+)- Ácido Láctico		100 – 3000
Outros ácidos	Ácido glucónico		0 – 2000
Compostos azotados (Aminoácidos)	Ácido glutâmico		1 – 390
	Ácido aspártico		1 – 107
	Treonina		1 – 362
	Serina		1 – 355

2.1.4. Constituição fenólica

Os polifenóis correspondem ao conjunto de compostos existentes nas uvas e nos vinhos que têm um grupo fenol na sua composição. Os compostos fenólicos desempenham um papel importante em enologia, dado que estes influenciam as características sensoriais do vinho, tais como a cor, corpo e adstringência e também a qualidade dos vinhos. Estes compostos são os grandes responsáveis pelas diferenças entre as uvas ou vinhos brancos e tintos. Esta diferença deve-se às antocianinas, polifenóis responsáveis pela cor dos vinhos tintos, e que apenas se encontram presentes nestes.

Os compostos fenólicos existentes nas uvas e nos vinhos podem ser classificados como não flavonóides e flavonóides. Esta classificação é feita tendo em conta a estrutura química específica.

2.1.4.1. Compostos não flavonóides

Os compostos não flavonóides, têm uma estrutura mais simples, mas a sua origem no vinho é mais diversa (Jackson, R. S., 2008). Desta classe de compostos fazem parte os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e outros derivados fenólicos como os etilbenos (resveratrol). As concentrações dos ácidos fenólicos estão na ordem dos 100-200 mg/l nos vinhos tintos e 10-20 mg/L nos vinhos brancos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Sete ácidos benzóicos, caracterizados pelo esqueleto C6-C1, foram identificados nas uvas e nos vinhos. Entre estes estão incluídos os ácidos: p-hidroxibenzóico; protocatecuico; vanílico; gálico; siríngico; salicílico e gentísico. A diferença entre estes ácidos está nos grupos substitutos do anel benzénico.

Os ácidos cinâmicos são caracterizados pelo esqueleto C6-C3. Os quatro ácidos cinâmicos presentes nas uvas e nos vinhos são os ácidos: p-coumárico; cafeico; ferúlico e sinápico. Apenas uma pequena parte destes compostos se encontra na forma livre. A maioria encontra-se esterificada pelo ácido tartárico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), recebendo a designação de ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são a terceira classe de compostos fenólicos solúveis mais abundantes nos bagos de uvas (Adams, O., 2006). Estes ésteres tartáricos são responsáveis pelo escurecimento oxidativo dos mostos e dos vinhos (Cabrita, M.J., 2003 ;Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) e constituem os compostos fenólicos mais abundantes nos vinhos brancos, tendo um papel importante na cor destes (Kennedy, J.A., 2006).

Na figura 1 apresenta-se a estrutura química base dos ácidos fenólicos existentes nas uvas e no vinho. Segundo Curvelo-Garcia (1988), as concentrações em cada um dos ácidos fenólicos pode variar entre 0,1 a 30 mg/L.

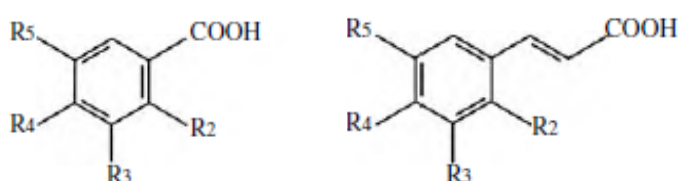


Figura 1. Estrutura química dos ácidos benzóicos (à esquerda) e dos ácidos cinâmicos (à direita) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.1.4.2. Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides caracterizam-se por apresentarem um esqueleto C6-C3-C6. A estrutura base é composta por dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (que contém oxigénio) (Zoecklein *et al.*, 1995; Jackson, R. S., 2008; Cabrita, M.J., 2003). Desta classe de compostos fazem parte os flavonóis, os flavanóis (ou 3- flavanóis), os taninos e as antocianinas (vinho tinto) (Cabrita, M.J., 2003). Esta classe de compostos pode encontrar-se livre ou polimerizado com outros flavonóides, açúcares, não flavonóides ou uma combinação destes.

As antocianinas e os taninos são os compostos fenólicos que desempenham maior influência nas características organolépticas do vinho.

As antocianinas são o principal pigmento vermelho do vinho tinto, sendo que a sua coloração sofre alteração com o pH do meio. Se o pH do meio for ácido estas apresentam uma coloração vermelha, mas se a coloração do meio for básica a sua coloração sofre uma alteração para azul-violeta. Contudo o conteúdo em dióxido de enxofre livre influencia mais a cor nos vinhos tintos novos do que o pH (Jackson, R. S., 2008) As antocianinas estão presentes maioritariamente na película da uva. Encontram-se também presentes nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme e na polpa das castas tintureiras (Cabrita, M.J., 2003). Para aumentar a intensidade da cor promove-se o contacto das películas da uva com o mosto sujeito a fermentação, pois o facto das antocianinas serem muito solúveis em etanol, facilita a dissolução destas.

Os taninos são compostos com massas moleculares entre 600-3500 Da, capazes de estabelecerem ligações estáveis com proteínas e outros polímeros constituintes das plantas, tais como os polissacáridos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os taninos encontram-se presentes na película, nas grainhas da uva e nos engaços e tal como as antocianinas são pouco solúveis em água e muito solúveis em etanol. São compostos incolores que ao reagirem com as antocianinas dão origem a complexos com uma coloração vermelho-acastanhado, característica do vinho tinto envelhecido. A condensação das antocianinas e taninos pode conduzir ao aparecimento de compostos instáveis responsáveis pelo aparecimento dum depósito acastanhado. A reacção dos taninos com proteínas conduz à formação de derivados insolúveis que ao precipitarem são responsáveis pela sensação de adstringência, que se traduz na perda de lubrificação da saliva.

2.1.5. Constituição polissacarídea

Os polissacáridos, como o próprio nome indica, são polímeros em que a unidade repetida é uma molécula de açúcar. Estes são um dos principais grupos de macromoléculas presentes no vinho e têm sido alvo de estudo devido às propriedades tecnológicas e sensoriais. Os polissacáridos desempenham um papel importante na estabilidade coloidal dos vinhos, devido à capacidade que têm em interagir e agregarem-se com os taninos (Riou *et al.*, 2002).

Os polissacáridos existentes no vinho provêm das uvas e das paredes celulares dos microorganismos. Os provenientes das uvas são as arabinogalactanoproteínas (AGP) e as ramnogalacturonanas (RG-II e RG-I) e os que provêm maioritariamente da parede celular das leveduras são as manoproteínas (MP) (Vidal *et al.*, 2003).

Vidal et al. (2003) procedeu ao fraccionamento dos polissacáridos do vinho tinto consoante a sua carga, por recurso às cromatografias: de troca aniónica; exclusão de tamanhos e afinidade. Os resultados demonstraram que as AGP e as MP são os polissacáridos com maior expressão nos vinhos, 42 e 35 %, respectivamente. A RG-II e a RG-I, por sua vez, representam, respectivamente, 19 e 4% dos polissacáridos totais.

A quantidade e a estrutura dos polissacáridos presentes no vinho depende do processo de vinificação, podendo ser modificadas por tratamento com enzimas (Ducasse et al, 2010). Doco *et al.* 2007 demonstrou que o uso de enzimas pectolíticas afecta a composição polissacarídea do vinho. As enzimas pectolíticas são utilizadas para favorecer a degradação da parede celular dos bagos das uvas, de modo a promover a extracção do aroma e dos compostos fenólicos para o vinho. Os resultados mostraram que existe, neste caso, um aumento da RG-II e uma diminuição dos polissacáridos ricos em arabinose e galactose, assim como também uma mudança particular nas AGP (com a perda dos resíduos de arabinose terminais).

2.1.5.1. Polissacáridos de origem vegetal

- **Arabinogalactanoproteínas (AGP)**

Nas uvas e no mosto predominam as arabinogalactanas (AG). Contudo estas no vinho encontram-se associadas a proteínas, recebendo por isso a designação de arabinogalactanoproteínas (AGP). Tipicamente, as AGP contêm menos do que 10% de proteínas (Pellerin et al, 1995).

As AG e as AGP do tipo II representam uma parte importante dos polissacáridos solúveis totais de um vinho, estando presentes numa concentração entre 100 a 200 mg/L num vinho tinto e entre 50 a 150 mg/L num vinho branco (Doco *et al.*, 2000). As AG e as AGP têm em comum características estruturais baseadas num núcleo interior ramificado (1→3)-D-galactano com cadeias laterais, (1→6)-D-galactano altamente substituídas por resíduos de arabinofuranosilo e em menores quantidades ramnose, xilose, ácido glucurónico e éter metiliterbutílico (4-O-*methyl ether*).

As AGP são polissacáridos ricos em arabinose e galactose e podem ser separadas em várias fracções com base nas diferentes densidades de carga negativa (Pellerin et al, 1995).

- **Ramnogalacturonanas (RG-II e RG-I)**

As ramnogalacturonanas (RG-I e RG-II) têm origem na parede celular pecto-celulósica dos bagos das uvas (Doco & Brillouet, 1993; Pellerin *et al.*, 1995; Pellerin *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2003).

A RG- II é dos principais polissacáridos do vinho e tem uma grande importância em enologia. Refira-se, a título de exemplo, que o facto da RG-II ser o polissacárido do vinho com maior densidade de carga negativa (Vernhet *et al.*, 1996; Pellerin *et al.*, 1996) pode fazer com que esta esteja envolvida em interacções electrostáticas e iónicas com outros componentes do vinho, que conduzem à formação de precipitados e ao aparecimento de turvação. A densidade de carga negativa está relacionada com a presença de açúcares ácidos na cadeia lateral. Os açúcares ácidos (ácidos urónicos), apresentam o grupo carboxila, sendo um dos seus principais componentes o ácido

galacturónico (Brett & Waldron, 1990), principal monómero que constitui a pectina (poliuronídeos) presente na parede celular das plantas.

Outras propriedades importantes têm sido atribuídas à RG- II, entre as quais se podem referir :

- o aumento do tamanho de partícula dos taninos, o que sugere que ocorre agregação entre estes e a RG-II (Riou *et al.*, 2002);
- a diminuição da adstringência em soluções modelo de vinho (Vidal *et al.*, 2004);
- a capacidade de complexar o chumbo (Pellerin *et al.*, 1997; Catarino *et al.*, 2008);
- o papel importante na estabilidade tartárica dos vinhos, visto que a sua presença demonstrou inibir a precipitação do hidrogenotartarato de potássio (KHT) (Gerbaud *et al.*, 1997).

Contudo, segundo Scollary *et al.* 1998, ao contrário do que era espectável, a RG- II revelou não ter uma grande capacidade em inibir o aparecimento da precipitação do tartarato de cálcio (CaT).

A RG- II é um polissacárido estruturalmente complexo, de baixo peso molecular, que se encontra ligado à cadeia homogalacturónica das pectinas e é composto principalmente por ramnose e ácido galacturónico. A RG- II contém 12 resíduos glicosídeos diferentes, incluindo vários monossacáridos raros como a apiose (Darvil *et al.*, 1978), 2-O-metilo-L-fucose (Darvil *et al.*, 1978), 2-O-metilo-D-xilose (Darvil *et al.*, 1978), ácido acérico (Spellman *et al.*, 1983), Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico) (York *et al.*, 1985) e Dha (ácido 3-desoxi-2-heptulosárico) (Stevenson *et al.*, 1988) e monossacáridos comuns que estão envolvidos em ligações glicosídicas pouco comuns (3,4-fucose ou ramnose completamente substituída). A RG- II tem 4 cadeias oligossacáridas laterais bem definidas que se encontram ligadas à estrutura principal composta por pelo menos 7 resíduos ácidos 1,4- α -D-galactosilurónico (Figura 2), embora a distribuição destas cadeias laterais na cadeia principal ainda não tenha sido determinada.

A RG- II nas paredes celulares das plantas encontra-se predominantemente na forma de um dímero reticulado por diéster-borato (dRG- II), que se encontra provavelmente localizado no resíduo da apiose.

O teor de RG- II por quilograma de uva é aproximadamente 250 mg e o seu conteúdo na película da uva é três vezes maior do que está presente no tecido pulpar (Vidal *et al.* 2001), o que corrobora o facto do teor deste polissacárido ser maior no vinho tinto (50-150 mg/L) do que no vinho branco (20-50 mg/L) (Vernhet *et al.* 1999). Este facto está relacionado com as diferentes técnicas de vinificação, uma vez que o vinho tinto é preparado pela fermentação de toda a uva (polpa e película), enquanto que o vinho branco é preparado por fermentação do sumo das uvas, resultante do esmagamento destas (equivalente à polpa).

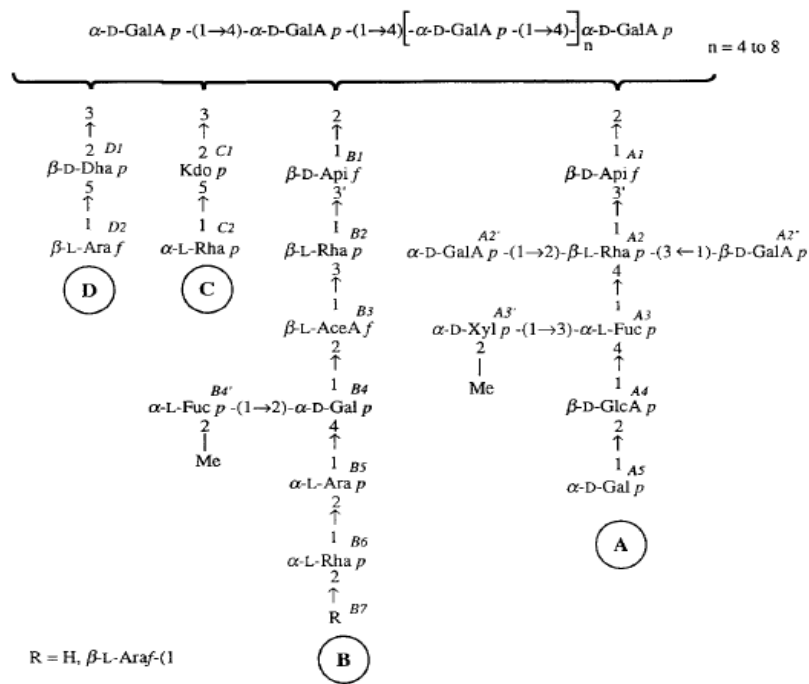


Figura 2. Estrutura hipotética da RG-II. A figura mostra as quatro cadeias glicosídicas laterais (A-D) na qual os resíduos estão numerados de acordo com a sequência modelo. (Pellerin *et al*, 1996)

A RG- I é outro importante polissacárido do vinho, que consiste na repetição do dissacárido [\rightarrow 2) - α -L-Rhap- (1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow], sendo relativamente abundante na parede das células da uva. Nos vinhos tintos, contudo, a RG- I apenas se encontra presente em pequenas concentrações (< 20 mg / L) (Doco *et al*, 2000). A composição deste polissacárido é complexa e é dominada pela presença de ramnose e ácido urónico. A sua alta carga negativa está relacionada com a presença de ácido galacturónico em grandes teores, e aumenta grandemente dentro da gama de valores de pH do vinho (Vernhet *et al*, 1999).

2.1.5.2. Polissacáridos com origem em leveduras

• Manoproteínas (MP)

As manoproteínas são libertadas pelas leveduras durante a fermentação (Llaubères, 1987). Estas encontram-se presentes em concentrações abundantes nos vinhos, 150 mg/L (Waters *et al*, 1994; Doco *et al*, 2000), e numa vasta gama de massas moleculares (Tabela 2).

A estrutura molecular das MP consiste numa cadeia péctica ligada a unidades de D-manose por ligações α -(1 \rightarrow 6), α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3). Waters *et al*. (1994) isolou e purificou as manoproteínas, libertadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, presentes num vinho tinto, tendo obtido uma manoproteína com uma massa molecular de 420 kDa.

Esta MP revelou ser constituída por 30% de proteínas e 70% de carboidratos (açúcares), dos quais 98% correspondiam a manose e os restantes 2% a glucose. A parte proteica das MP era maioritariamente constituída por serina, glicina, treonina e alanina.

Dada a importância das massas moleculares nos processos de separação com membranas apresenta-se, de seguida, uma tabela resumo (Tabela 2) onde se encontram reunidas as informações referentes às massas moleculares dos principais polissacáridos e de alguns dos polifenóis presentes no vinho, assim como também as respectivas concentrações destes no vinho tinto.

Tabela 2. Massas moleculares dos principais polissacáridos e de alguns compostos fenólicos presentes no vinho. Para os polissacáridos é também indicado o seu teor médio no vinho tinto.

Compostos do vinho		Peso Molecular (kDa)	Referências Bibliográficas (Massas moleculares)	Teor no vinho tinto (mg/L)	Referências Bibliográficas (teores do vinho tinto)	
Polifenóis	Antocianinas	0,5-2	Lipnizki, F. (2010)	800-1800	Carvalho, E. (2007)	
	Taninos	0,6-3,5	Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> (1998)			
Polissacáridos	RG-II	9-10	Vernhet <i>et al.</i> (1999)	50-150	Vernhet <i>et al.</i> (1999)	
		5,3 (pelo método de dispersão da luz) 9,8 (por cromatografia de exclusão de tamanho)	Pellerin <i>et al.</i> (1996)			
	RG-I	50-70	Vernhet <i>et al.</i> (1999)	20-50		
		44-52	Vidal <i>et al.</i> (2003)			
	Manoproteínas (MP)	30-400	Vernhet <i>et al.</i> (1999)	100-150		
		50-530	Vidal <i>et al.</i> (2003)			
	Arabinogalactanoproteínas (AGP)		180-260	Pellerin <i>et al.</i> , 1995		-----
		AGP0	150-170	Vernhet <i>et al.</i> (1999)		100-150
		AGP3	220-240			30-50
			48-192	Vidal <i>et al.</i> (2003)		-----

3. Processos de separação com membranas

Os processos de separação com membranas são usados na indústria vitivinícola nas etapas de: clarificação, estabilização tartárica e estabilização biológica (de Pinho, M.N., 2010).

A aplicação de processos de membranas na indústria alimentar reveste-se de muitas vantagens quando comparada com outros processos de separação convencionais, como a destilação, a extracção com solventes e a cristalização. Referiram-se as seguintes: o consumo energético é inferior; não ocorre degradação térmica de compostos termicamente instáveis; a retenção do sabor é assegurada, dado que não é necessário operar a temperaturas elevadas; não requer aditivos e os custos de capital são inferiores. A desvantagem destes processos deve-se à ocorrência de fenómenos de polarização de concentração e colmatação das membranas (consultar secção 3.3.2). Estes fenómenos são mais acentuados nas situações em que se trabalha com fluxos de permeação elevados, como é o caso da MF e da UF com alimentações complexas.

As membranas são barreiras selectivas entre duas fases (alimentação/concentrado e permeado). A separação é conseguida pela permeação, isto é, passagem selectiva através da membrana de um ou mais compostos presentes na corrente de alimentação, enquanto é retardada a passagem de um ou outros compostos.

Existem diversos tipos de processos de separação com membranas, que diferem consoante o tipo de membrana (biológica ou sintética) e a força motriz responsável pelo transporte de massa através da membrana (gradiente de: pressão, concentração ou temperatura; ou acção de um potencial eléctrico). Os processos mais usuais utilizam o gradiente de pressão como força motriz. Entre estes incluem-se a: microfiltração (MF); ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI). Processos como a pervaporação e a diálise utilizam como força motriz o gradiente de concentração. Outros processos como a electrodiálise (ED) e a destilação com membranas usam como força motriz, respectivamente, a acção de um campo eléctrico e o gradiente de temperatura.

3.1. Modos de funcionamento dos processos de separação com membranas

Nos processos convencionais de filtração (estáticos), a alimentação circula perpendicularmente à membrana (Figura 3). Tal conduz à formação de uma camada, denominada por bolo filtrante, sob a superfície da membrana. A espessura do bolo filtrante vai aumentando com o decorrer do tempo, o que conduz a um aumento da resistência à filtração. Tal explica que estes processos necessitem de operar em descontínuo. Nestes processos o permeado ao atravessar o bolo filtrante, aumenta as hipóteses de ocorrer a adsorção de compostos orgânicos.

Nos processos de separação com membranas controlados pela pressão (acima referidos) a alimentação circula tangencialmente à membrana, razão pela qual estes processos são também conhecidos por filtração tangencial. Nestes processos a alimentação divide-se em duas correntes, concentrado e permeado. A corrente de permeado é constituída pelos compostos com um tamanho inferior ao limite de exclusão molecular (MWCO) da membrana.

Na figura 3 representam-se esquematicamente os dois modos de funcionamento dos processos com membranas.

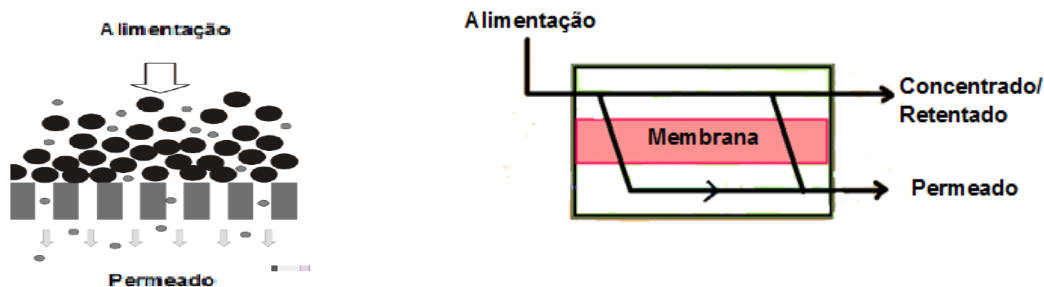


Figura 3. Modos de funcionamento dos processo de separação com membranas. Representação esquemática da filtração convencional (à esquerda) e da filtração tangencial (à direita).

3.2. Modos de operação dos processos de separação com membranas

Entre os diferentes modos de operação dos processos de separação com membranas, referem-se apenas os dois de interesse para o presente trabalho, sendo estes: o modo de recirculação total e o modo de concentração.

No modo de recirculação total, tanto o concentrado como o permeado são recirculados ao tanque de alimentação, não havendo por isso alterações na composição da alimentação. No modo de concentração apenas o concentrado é recirculado ao tanque de alimentação, sendo o permeado, continuamente, colectado noutro tanque.

3.3. Processos de separação com membranas controlados pela pressão

Dado que um dos objectivos do presente trabalho é o fraccionamento dos polissacáridos do vinho por UF, apresenta-se de seguida uma tabela (tabela 3) na qual se resumem as características diferenciadoras dos processos de separação com membranas, que tal como a UF, são controlados pela pressão.

Tabela 3. Características diferenciadoras dos processos de separação controlados pela pressão (Adaptado de Cheryan, 1998 e Mulder, 1996).

Processo de separação	Tamanho de partícula (nm) ou massa molar (Da)	Gama de pressões de operação (bar)	Material retido	Mecanismo de separação
MF	> 100 nm	0,1-2	Material em suspensão	Exclusão molecular
UF	10^3 - 10^6 Da	1-5	Colóides, Macromoléculas	Exclusão molecular/Difusão
NF	10^2 - 10^3 Da	5-20	Moléculas de peso molecular médio	Difusão/Exclusão molecular

Observa-se pela tabela 3 que a UF é de facto o processo de separação com membranas adequado ao fraccionamento dos polissacáridos do vinho.

3.3.1 Ultrafiltração

A UF, conjuntamente com a MF tangencial, tem vindo a ser muito utilizada na etapa de clarificação do vinho. Após a fermentação, o vinho pode apresentar um aspecto turvo. Segundo, Feuillat, 1987 a turvação deve-se à presença de material em suspensão, resíduos de levedura e macromoléculas com comportamento coloidal. Contudo, o problema que se levanta na utilização destes processos está relacionado com o decréscimo dos fluxos de permeação ao longo do tempo, devido à colmatação das membranas. A colmatação deve-se principalmente à adsorção de moléculas como os polissacáridos e os polifenóis sobre a superfície da membrana (Vernhet *et al.* 1999; Cameira *et al.*, 1994; Czekaj, 2000). Vernhet *et al.* (1999) observou, para uma solução modelo de vinho, que o declínio dos fluxos de permeação eram dependentes da concentração de polissacáridos, assim como também da natureza e estrutura dos polissacáridos testados (RG- II, RG- I, AGP, MP) . Neste estudo, os autores observaram que o declínio dos fluxos durante a MF do vinho, com membranas orgânicas (polietersulfona), pareciam ser mais dependentes das quantidades em que os diferentes polissacáridos estavam presentes, do que do conteúdo total em polissacáridos. Verificou-se existir uma relação entre os pesos moleculares dos polissacáridos e o efeito que estes provocavam nos fluxos. Quanto maior o peso molecular do polissacárido maior a diminuição do fluxo de permeação, sendo que as MP (com massas moleculares compreendidas entre 30 e 400 kDa) revelaram ser as que têm maior efeito na diminuição dos fluxos. Estes autores observaram contudo que este efeito é reduzido na presença de polissacáridos pécticos, tendo sugerido que o desempenho da membrana depende do balanço entre os polissacáridos provenientes da levedura e da uva.

Contudo no caso de uma membrana mineral do tipo alumina, a RG-II revelou ser fortemente responsável pela colmatação dessa membrana (Belleville *et al.* 1992) provavelmente devido à sua elevada densidade de carga negativa (Vernhet *et al.*, 1996), apesar da sua baixa massa molecular (10 kDa- consultar tabela 2).

Cameira dos Santos (1995) demonstrou que também os polifenóis desempenham um papel importante na colmatação das membranas. Este autor observou a existência de polifenóis, assim como também polissacáridos, adsorvidos à superfície da membrana. Neste estudo utilizou-se uma membrana de MF de polietersulfona.

A clarificação por UF está otimizada em termos de produtividade e da preservação das características organolépticas, como o sabor e o aroma (De Pinho, M.N, 2010). Contudo, a remoção de macromoléculas, como os polissacáridos, durante esta etapa pode tornar o vinho instável do ponto de vista das precipitações tartáricas.

3.3.2 Fenómeno de polarização da concentração e colmatção das membranas. Modelo das resistências em série e Modelo do filme.

Um dos problemas associados aos processos de filtração tangencial diz respeito ao declínio dos fluxos de permeação ao longo do tempo, tal como acima foi referido. Este declínio deve-se a diversas condições que propiciam o *fouling* (entupimento) da membrana.

O fluxo de permeação é definido como a quantidade de matéria que atravessa a membrana por unidade de área e de tempo, sendo geralmente expresso em $L \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Nos processos de separação com membranas controlados pela pressão, em que o solvente puro usado é a água, verifica-se uma relação linear entre o fluxo de permeação e a pressão (Equação 1).

$$J_P = L_P \times \Delta P \quad (1)$$

Onde, J_P representa o fluxo de permeação, ΔP o gradiente de pressão e L_P a permeabilidade hidráulica da membrana, que depende da dimensão e do número de poros.

A existência de solutos faz com que se verifique uma diminuição do fluxo em relação ao fluxo do solvente puro. A membrana, tal como foi referido anteriormente, é selectiva a um ou mais solutos, permitindo a permeação destes através da sua superfície, sendo que os que ficam retidos formam uma camada sob a superfície desta. Esta camada funciona como uma resistência adicional à transferência de massa e origina um fenómeno designado por polarização da concentração (Figura 4). Este fenómeno é de particular importância no caso da ultrafiltração de macromoléculas.

Existem outros factores que propiciam o aparecimento de resistências adicionais, tais como: a interacção entre os solutos e a membrana e o tamanho e a morfologia da membrana. Estes factores conduzem ao entupimento dos poros, à formação de uma camada de gel, e à adsorção de alguns compostos sob a superfície da membrana. O fluxo de permeação, neste caso pode ser descrito por:

$$J_P = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_a + R_{pc} + R_g + R_p)} \quad (2)$$

Onde, μ é a viscosidade e os restantes termos em denominador dizem respeito às diferentes resistências: R_m é a resistência intrínseca da membrana; R_a é a resistência causada pela adsorção; R_p é a resistência causada pelo entupimento dos poros; R_g é a resistência da camada de gel e R_{pc} é a resistência devido à polarização da concentração.

A equação 2 descreve o modelo das resistências em série.

Condições operatórias como a velocidade de escoamento tangencial e o gradiente de pressão podem ser utilizadas para minimizar a formação da zona de polarização e da camada de gel. Por exemplo, um aumento da velocidade tangencial traduz-se num aumento da turbulência e contribui para uma diminuição da espessura da camada de gel, o que consequentemente se traduz num aumento da velocidade de permeação.

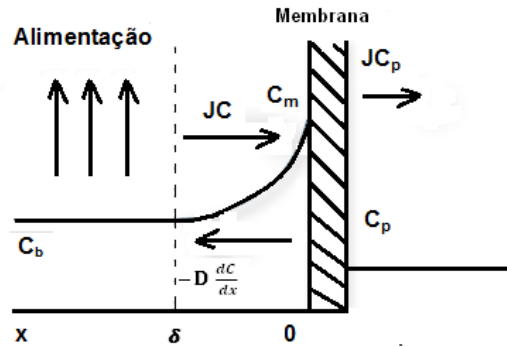


Figura 4. Representação da polarização de concentração e dos perfis de concentração da fase fluída (em estado estacionário).

O modelo do filme descreve os mecanismos de transferência de massa em UF com base em três fluxos (figura 4) que são o fluxo convectivo (JC) em direção à membrana, o fluxo do soluto através da membrana (JC_p) e o fluxo difusivo da membrana para a solução. Este último fluxo é descrito pela lei de Fick: $-D \frac{dC}{dx}$ e tem sentido oposto ao fluxo de permeação pelo que funciona como uma resistência extra ao transporte de massa.

O modelo de filme supõe a existência de um filme de espessura δ , onde se desenvolve um gradiente de concentração do soluto. O balanço ao soluto em estado estacionário é dado por:

$$JC + D_{AB} \frac{dC}{dx} = JC_p \quad (3)$$

Onde C_p é a concentração do soluto no permeado e D_{AB} é a difusividade do soluto A na solução ($m^2 \cdot s^{-1}$).

A integração desta equação com as seguintes condições fronteira:

$$x = 0 \quad C = C_m$$

$$x = \delta \quad C = C_b$$

Onde, C_m e C_b são, respectivamente as concentrações do soluto na membrana e na alimentação, resulta na expressão:

$$\frac{C_m - C_p}{C_b - C_p} = \exp\left(\frac{J\delta}{D_{AB}}\right) \quad (4)$$

Segundo a teoria do filme o coeficiente de transferência de massa, k ($m \cdot s^{-1}$) é dado por:

$$k = \frac{D_{AB}}{\delta} \quad (5)$$

Por substituição da expressão (5) em (4), obtém-se a expressão global da polarização da concentração.

$$\frac{C_m - C_p}{C_b - C_p} = \exp\left(\frac{J}{k}\right) \quad (6)$$

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

4. Estabilidade Tartárica

4.1. Precipitações tartáricas

As precipitações tartáricas são um fenómeno natural da evolução dos vinhos e podem ocorrer durante a vinificação, a maturação ou após engarrafamento .

Os cristais de tartarato, apesar de não representarem um problema para a saúde, se aparecerem após o engarrafamento, prejudicam a apresentação do vinho colocado no mercado e conduzem a uma falta de confiança por parte do consumidor relativamente à qualidade desse vinho. Por essa razão tem sido feito um esforço na tentativa de evitar a formação de depósitos cristalinos em garrafas, visto que estes são muitas vezes interpretados como lascas de vidro,.

Nas últimas décadas tem-se dado ênfase ao estudo das precipitações de sais tartáricos em vinhos, principalmente o bitartarato de potássio (KHT) e o tartarato neutro de cálcio (CaT). A estabilização tartárica dos vinhos, é normalmente garantida pelo favorecimento da precipitação dos cristais, sendo estes de seguida removidos. Menos frequentemente, esta pode ser conseguida pelo atraso ou inibição da cristalização (Jackson, R.S., 2008).

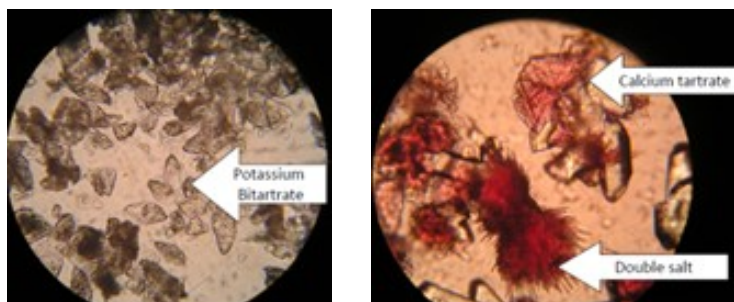
Ao pH do vinho e mediante a presença inevitável dos iões de K^+ e Ca^{2+} , o ácido tartárico encontra-se, principalmente, salificado nas seguintes formas: 1) Hidrogenotartarato de potássio (KHT); 2) tartarato de potássio (K_2T); 3) tartarato neutro de cálcio (CaT); 4) tartarato de potássio e cálcio; 5) tartomalato de cálcio (sal duplo de cálcio), de acordo com os seus dois balanços de dissociação (TH^- e T^{2-})

O tartarato de potássio e cálcio e o tartomalato de cálcio caracterizam-se por se formarem e permanecerem estáveis a valores de pH superiores a 4,5. Apesar deste ponto em comum, estes dois sais diferem nas solubilidades. O tartarato de potássio e cálcio é solúvel, o que não se verifica com o tartomalato de cálcio, que como é relativamente insolúvel precipita, em formato de agulha.

O KHT e o CaT estão associados a problemas de instabilidade em vinhos, dado que conduzem à formação de depósitos cristalinos (Figura 5). A cristalização destes sais tartáricos assume-se de grande importância, devido à baixa solubilidade, existindo muita literatura especializada sobre o assunto (Marsh e Joslyn, 1935; Berg e Keefer, 1958 e 1959; Postel, 1984; Maujean *et al*, 1985; Abgueuen e Boulton, 1993; McKinnon *et al.*, 1995 e 1996; Gerbaud *et al.*, 1997).

Na exposição que se segue focar-se-ão estes dois sais tartáricos, contudo, e apesar da inúmera bibliografia existente sobre a precipitação do KHT, dar-se-á mais detalhe à precipitação do CaT dado que tal constitui o objectivo do presente trabalho.

Figura 5. Aspecto dos cristais de KHT (à esquerda) e CaT (à direita).



4.1.1. Bitartarato de potássio

Durante a transformação do mosto em vinho produz-se etanol. O KHT apesar de ser perfeitamente solúvel em água é relativamente insolúvel em etanol, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4. Solubilidade do bitartarato de potássio em água e numa solução aquosa de etanol a 20 °C (Ribéreau-Gayon, 2006).

KHT em água	KHT em ETOH (10%(v/v))
5,7 g/L	2,9 g/L

A presença de etanol diminui a solubilidade do KHT (principal sal tartárico existente no vinho). Desta forma, o vinho encontra-se sobressaturado neste sal, o que pode conduzir à ocorrência de precipitação.

Segundo Maujean *et al.* (1985) o KHT apresenta uma zona de meta-estabilidade muito alargada, razão pela qual a ocorrência da precipitação deste sal é difícil de prever. Por diminuição da temperatura duma solução estável de KHT, atinge-se a temperatura abaixo da qual o vinho se encontra sobressaturado neste sal (temperatura de saturação). Apesar de nesta fase existirem condições termodinâmicas para que a precipitação ocorra, isso não acontece. A precipitação espontânea do KHT apenas ocorre espontaneamente a temperaturas inferiores à temperatura de cristalização (Gonçalves, F., 2001).

A dissociação do ácido tartárico é influenciada pelo pH, pelo que a concentração dos iões H_2T/TH^- e T^{2-} em solução variam com o pH, podendo conduzir à precipitação de KHT. A formação de KHT é favorecida para valores de pH compreendidos entre 3,5 a 4, dado que a este pH a proporção de iões TH^- é máxima (Zoecklein *et al.*, 1995), conforme se ilustra na figura 6.

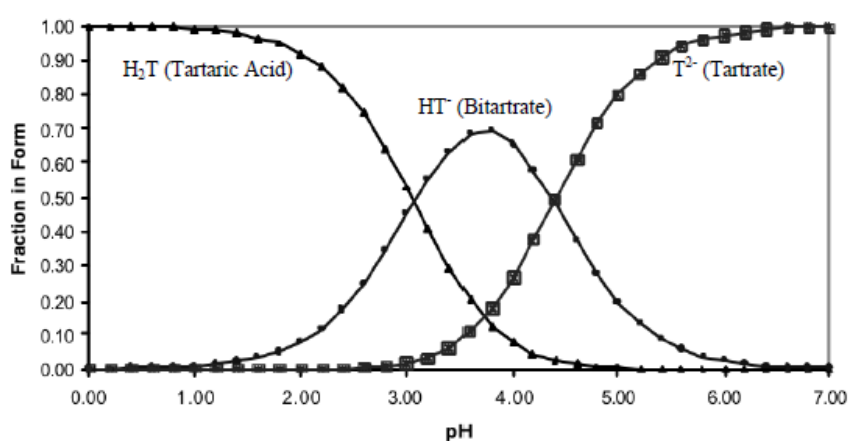


Figura 6. Curva de solubilidade do tartarato. (Smith, V., 2012)

Contudo e tal como já foi mencionado anteriormente existem colóides no vinho que funcionam como inibidores das precipitações tartáricas no vinho, razão pela qual são designados de colóides protectores. Maujean *et al.* (1985) comprovaram este efeito ao observar que estes colóides

contribuíam para o alargamento da zona de meta-estabilidade do KHT. Segundo, Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) estes colóides inibem o crescimento dos núcleos e a cristalização do KHT.

Os colóides protectores incluem proteínas, taninos condensados, glúcidos poliméricos, tais como as pectinas e as gomas, ou seja, polissacáridos neutros (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Macromoléculas de origem microbiana, como as manoproteínas de leveduras, revelaram ter um grande efeito inibidor na cristalização do KHT (Lubbers *et al.*, 1993).

Gerbaud *et al.* (1997) testaram a influência que os polissacáridos e os polifenóis, presentes no vinho, têm na cristalização do KHT. Este estudo foi realizado em vinho, tinto e branco, e numa solução hidroalcoólica sobressaturada em KHT, tendo-se observado que a cristalização do KHT ocorre mais dificilmente no vinho tinto do que no branco e ainda mais dificilmente do que numa solução hidroalcoólica.

O efeito inibidor natural demonstrado pelo vinho tinto, foi atribuído ao efeito cumulativo das ramnogalacturonanas (RG-I e RG-II), das manoproteínas de leveduras e dos polifenóis totais. Os baixos teores de RG-II e polifenóis totais no vinho branco favorecem o aparecimento dos cristais.

Estes autores observaram também que manoproteínas extraídas das paredes das células de levedura apresentam um efeito na inibição da cristalização do KHT muito mais acentuado do que as manoproteínas de leveduras presentes no vinho.

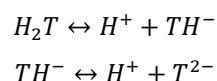
4.1.2. Tartarato de cálcio

A instabilidade causada pelo CaT é mais difícil de controlar do que a induzida pelo KHT, para o qual, tal como foi referido acima, existe um teste de estabilidade a frio estabelecido (McKinnon, 1995; Jackson, R.S., 2008). Segundo Berg e Keefer (1959), a experiência industrial demonstra que os vinhos que podem estar sujeitos à precipitação de CaT são difíceis de estabilizar mesmo que sejam acondicionados no frio durante longos períodos de tempo. A precipitação de CaT é, contudo, menos comum.

4.1.2.1. Processo de cristalização

A cristalização do CaT envolve as seguintes fases: 1) Fase de sobressaturação; 2) Fase de nucleação e 3) Fase de crescimento.

O teor de CaT no vinho depende das concentrações dos iões cálcio e tartarato existentes neste. O ácido tartárico (H_2T) trata-se de um ácido diprótico. Os dois balanços de dissociação deste ácido são descritos por:



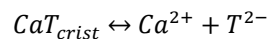
A concentração do ião tartarato (T^{2-}) no vinho encontra-se assim dependente destes dois balanços. A quantidade de cálcio presente no vinho, contudo, depende não só da quantidade presente na uva e noutras partes do cacho (origem endógena) como também de operações tecnológicas que envolvem a sua incorporação (origem exógena). O cálcio pode ser adicionado sob a forma de bentonite cálcica com o objectivo de tratar o vinho ou mosto, ou sob a forma de carbonato de cálcio quando o que se pretende é desacidificar o vinho. O aumento da concentração de cálcio

nos vinhos pode também dever-se à utilização de fermentadores de cimento, de filtros ou de agentes clarificantes (Ribéreau-Gayon, 2006; Jackson, R.S., 2008).

Ao longo das últimas décadas foram estudados possíveis métodos capazes de avaliar e prever a estabilidade do CaT no vinho.

O método tradicional é o método do produto de concentração. Este método consiste no cálculo do produto de concentração (PC) do vinho e na comparação deste valor com o produto de estabilidade de referência (Berger e Keefer, 1959; McKinnon *et al*, 1995).

O equilíbrio que descreve a solubilidade deste sal é descrito por:



O produto de solubilidade é definido por:

$K_{PS} = K[TCa] = a_{Ca^{2+}} \cdot a_{T^{2-}} = \gamma_{Ca^{2+}} \cdot \gamma_{T^{2-}} \cdot [T^{2-}] \cdot [Ca^{2+}]$, onde a e γ representam, respectivamente, a actividade e o coeficiente de actividade de cada ião (Berger e Keefer, 1959; Abguenguen e Boulton, 1993; Lasanta e Gómez, 2012).

O produto de concentração do CaT define-se por:

$PC = [T^{2-}]_r [Ca^{2+}]_r$, em que o índice r se refere às concentrações reais dos iões. Quando este produto é superior ao produto de solubilidade, K_{PS} , o vinho está sobressaturado, podendo consequentemente ocorrer precipitação. O CaT tem tendência para soluções sobressaturadas e metaestáveis, tal como acontece com o KHT.

Constatou-se, empiricamente, que este método tem pouco valor a prever a instabilidade causada pelo CaT (Müller, 1990; McKinnon *et al*, 1995), pelo facto de ser difícil fazer uma comparação precisa entre os produtos de concentração e o produto de solubilidade, pois não só são necessárias concentrações exactas dos iões livres de Ca^{2+} e tartarato (T^{2-}), como os cálculos também devem ser corrigidos tendo em consideração os efeitos de actividade, tais como, a força iónica, a temperatura e o teor alcoólico.

O teste do mini-contacto é outro método que também pode ser usado para prever a estabilidade do CaT e assenta no facto da nucleação homogénea induzida ser mais rápida do que a nucleação primária ou espontânea. Com o uso deste método, o crescimento dos cristais é favorecido pela adição de cristais de nucleação (“*seed crystals*”). Este método é de difícil implementação em larga escala, quer porque os cristais de nucleação não estão disponíveis à escala industrial, quer também pelo facto de ser difícil mantê-los na forma adequada (McKinnon *et al*, 1995).

McKinnon *et al.* (1994), descobriu que a primeira etapa na precipitação do CaT é a formação de uma espécie solúvel de CaT (CaT_{aquoso}) a qual por agregação pode conduzir à ocorrência de nucleação.

4.1.2.2. Cinética de cristalização

Embora a cinética de cristalização do CaT deva ser maior do que a do KHT, o tempo necessário para que se dê a nucleação espontânea do CaT é muito maior (Abguenguen e Boulton, 1993; Ribéreau-Gayon, 2006), pelo que a precipitação do CaT ocorre muito mais lentamente do que a do KHT (Postel, 1983). É desta forma facilmente perceptível porque é que a precipitação de CaT ocorre no vinho, geralmente, após vários anos de envelhecimento. A etapa limitante da cristalização do CaT

no vinho é então a nucleação, pelo que o recurso a cristais de CaT se revela de interesse, uma vez que estes induzem a nucleação passando, neste caso, a integração superficial a ser a nova fase limitante do processo (Abguenguen e Boulton, 1993).

A cinética de cristalização do CaT, em soluções modelo e em vinhos, foi estudada por recurso a cristais de nucleação, tendo-se concluído que o crescimento dos cristais ocorre segundo uma reacção de segunda ordem (Abguenguen e Boulton, 1993; McKinnon, 1995) e é influenciado por factores como a força iónica e o teor alcoólico.

4.1.2.3. Factores que afectam a precipitação do tartarato de cálcio

Os factores mais determinantes do produto de solubilidade, tais como, a temperatura, o teor alcoólico em volume e o pH influenciam a solubilidade do CaT nos vinhos (Curvelo-Garcia, 1988).

De seguida apresenta-se, a influência que cada um destes factores, incluindo a força iónica, têm na precipitação do CaT.

- **Temperatura**

A solubilidade do CaT não é muito sensível à temperatura, como acontece no caso do KHT. Assim, o CaT é quase três vezes mais solúvel a 20° C do que a -4° C (Postel, 1993; Ribéreau-Gayon 2006). A diminuição da temperatura não se revela, desta forma, eficaz na estabilização tartárica deste sal, como no caso do KHT. Tal deve-se ao facto de, no caso do KHT, a diminuição da temperatura conduzir a nucleação extensiva, que favorece a precipitação, enquanto que para o CaT, os cristais são incapazes de sofrerem nucleação no vinho (Abguenguen e Boulton, 1993; Berg e Keefer, 1958 e 1959).

- **pH**

A precipitação do CaT é muito dependente do pH (Abguenguen e Boulton, 1993; McKinnon, 1995). A percentagem de T^{2-} existente no vinho, resultante da dissociação do ácido tartárico, varia com o pH. Para valores de pH > 3, a percentagem de iões na forma T^{2-} vai aumentando, até atingir um valor máximo, a um pH de cerca de 6,5 (Smith, 2012). Como tal, com o aumento do pH, este ião estará mais disponível para se ligar ao cálcio e formar o CaT.

McKinnon *et al.* (1995), testaram a influência do pH na precipitação do CaT, tendo concluído que soluções com maior pH, precipitam mais CaT. Desta forma fenómenos, tais como a fermentação maloláctica, que conduzem a um aumento do pH do vinho criam condições que favorecem a precipitação deste sal.

- **Teor alcoólico em volume**

Segundo Abguenguen e Boulton (1993), uma diminuição do teor alcoólico em volume provoca uma diminuição na velocidade de crescimento dos cristais.

McKinnon *et al.* (1995) avaliaram a influência do teor em etanol, no tempo de indução associado à precipitação do CaT, e na velocidade de crescimento dos cristais, tendo verificado que um aumento do teor de etanol conduziu a uma diminuição no tempo de indução, sendo que o tempo de indução

corresponde ao período de tempo associado ao início do processo de nucleação. Estes autores observaram também, em concordância com o que foi mencionado anteriormente, que um aumento do teor em etanol provoca um aumento da velocidade de cristalização do CaT, o que segundo estes se pode dever, em parte, ao facto do aumento da concentração em etanol provocar uma diminuição no produto de solubilidade do CaT.

- **Força iónica**

Um aumento da força iónica, causado pela adição de cloreto de sódio, demonstrou ser responsável por uma diminuição na velocidade de crescimento dos cristais de CaT (Abguenguen e Boulton, 1993; McKinnon *et al.*, 1995).

Segundo Abguenguen e Boulton (1993), este efeito pode dever-se ao facto do NaCl agir como uma impureza e interromper o crescimento do cristal de CaT. Esta hipótese foi suportada pelos resultados obtidos por McKinnon *et al.* (1995).

4.1.2.4. Inibidores da precipitação do tartarato de cálcio presentes no vinho

Para que surja um método capaz de prever a estabilidade do CaT é primordial saber qual o efeito que os compostos constituintes do vinho desempenham na nucleação. A nucleação do CaT pode ser prevenida ou mesmo impedida por compostos que se liguem a um ou aos dois iões intervenientes no equilíbrio de formação do CaT. Desta forma, ao diminuir-se a quantidade de iões de cálcio e tartarato presentes em solução, diminui-se a sobressaturação. Também se pode dar o caso do composto se ligar aos agregados formados pela espécie solúvel de CaT, impedindo desta forma a formação do núcleo crítico. O crescimento dos cristais pode também ser reduzido por inibidores, que se liguem à superfície do cristal bloqueando o crescimento deste.

A presença de ácido málico demonstrou inibir a precipitação do CaT, durante a fase em que a nucleação controla o crescimento do cristal (Clark *et al.*, 1988; McKinnon, 1995), por diminuição da velocidade de cristalização. Além do ácido málico, outros ácidos orgânicos existentes no vinho foram estudados de modo a averiguar qual a influência que têm na precipitação do CaT. A ordem de inibição demonstrada pelos ácidos orgânicos testados foram: ácido cítrico > ácido málico > ácido láctico > ácido sucínico. A adição destes ácidos, à mesma concentração mássica, foi feita a uma solução modelo hidroalcoólica (McKinnon *et al.*, 1995). Estes resultados demonstraram assim que os ácidos carboxílicos que contêm grupos funcionais carboxilo e/ou hidroxilo adjacentes são inibidores eficientes da cristalização espontânea do tartarato de cálcio.

Pellerin *et al.* (2013) apresentam a influência que os polissacáridos que constituem o vinho têm na precipitação do CaT. Este estudo foi realizado, igualmente, numa solução hidroalcoólica de vinho, tendo conduzido às seguintes conclusões:

- A RG-I demonstrou ser o inibidor mais efectivo, como consequência de ter a capacidade de participar na sequestração dos iões de cálcio;
- A RG-II apesar de ser estruturalmente mais complexa do que a RG-I demonstrou apresentar uma menor influência no tempo de indução associado à precipitação do CaT;
- As AGP e as MP revelaram ter pouco a nenhum efeito no tempo de indução do CaT.

5. Tratamentos de estabilização tartárica

5.1. Métodos Físicos

Existem diferentes métodos físicos que podem ser usados na estabilização tartárica de vinhos. Entre estes estão o tratamento pelo frio. Este tipo de tratamento, mais frequentemente usado, envolve dois procedimentos principais, sendo estes, a estabilização lenta sem adição de cristais e estabilização rápida com adição de cristais de KHT, e visa reduzir a solubilidade dos sais tartáricos, favorecendo assim a precipitação.

A estabilização tartárica pode ser conseguida também por redução do teor de K^+ e Ca^{2+} , e consequente diminuição do estado de sobressaturação do vinho. Para tal, recorre-se a processos físicos de separação com membranas, tais como, a electrodiálise, a nanofiltração/microfiltração e a permuta catiónica.

5.1.1. Tratamento pelo frio

5.1.1.1. Estabilização lenta sem adição de cristais

O tratamento pelo frio é a técnica de estabilização do vinho mais largamente usada e consiste em arrefecer o vinho até uma temperatura perto do seu ponto de congelamento e posteriormente armazená-lo durante um período de tempo que pode variar entre 3 dias a 3 semanas, sendo 1 semana a situação mais comum (Blouin, 1982). O objectivo deste tratamento é reduzir a solubilidade dos sais tartáricos para valores muito abaixo das suas constantes de solubilidade e, desta forma, favorecer a separação dos sais em excesso. Este tratamento contudo não é efectivo para o CaT (Maujean, Malherbe & Dupont, 1984; Lasanta e Gómez, 2012) e é uma técnica que consome tempo e energia.

5.1.1.2. Estabilização rápida com adição de cristais de KHT (Método de contacto)

A adição de cristais de KHT finamente divididos, permite aumentar a eficiência do tratamento pelo frio. Os cristais adicionados funcionam como núcleo de cristalização e, deste modo, permitem aumentar a temperatura de operação e reduzir grandemente a duração do tratamento. A técnica descrita é designada por método de contacto e foi proposta por Müller (1979). A temperatura empregue neste método varia entre 0-1° C, sendo a duração óptima de 5h. Os cristais de KHT são adicionados numa dose de 4g/L, sob agitação constante. Segundo Blouin (1982), o método de contacto tem resultados semelhantes ao método convencional (sem adição de cristais) e não afecta negativamente as características sensoriais do vinho. Além disto, e contrariamente ao tratamento pelo frio clássico, a aplicação do método de contacto com a adição de cristais de CaT é efectivo na redução da concentração de cálcio, e contribui também para induzir a precipitação do KHT. Contudo este método é dispendioso e requer uma duração de 2 a 7 dias. Este tratamento pode operar em modo contínuo, contudo devido ao alto custo associado não tem sido aplicado numa larga escala (Lasanta e Gómez, 2012).

5.1.2. Electrodiálise

A electrodiálise é utilizada com sucesso na estabilização tartárica de vinhos na Europa, América e nos últimos anos tem começado a ser testada ou implementada em algumas indústrias vinícolas na Austrália.

Neste método recorre-se à utilização de campos eléctricos e de membranas selectivas a iões para separar os sais tartáricos do vinho sem refrigeração ou precipitação (Escudier *et al.*, 1993). As membranas catiónicas ou aniónicas, encontram-se separadas por um espaçador e agrupadas sequencialmente, de modo a comporem uma pilha de electrodiálise (Figura 7).

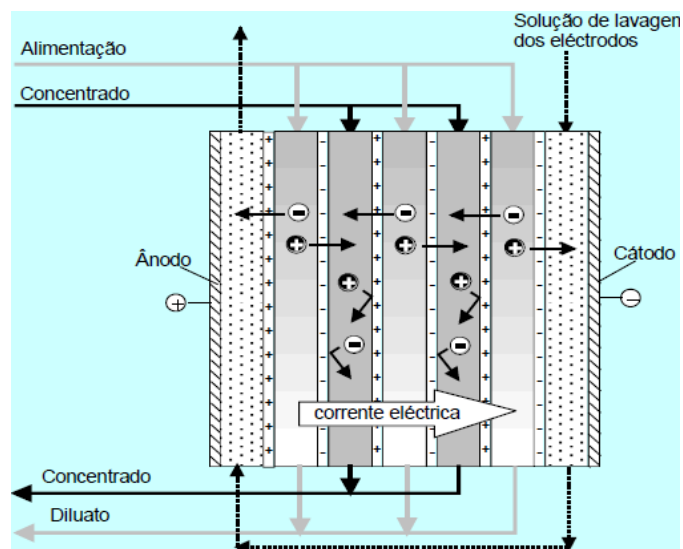


Figura 7. Esquema de um empilhamento de ED (Cameira dos Santos, 2008).

Por aplicação de um campo eléctrico, os catiões migram em direcção ao cátodo, atravessando a membrana permeável aos catiões, passando desta forma do compartimento do diluato para o concentrado. Os catiões ficam concentrados no compartimento do concentrado, dado que a membrana seguinte é apenas permeável aos aniões. Deste modo, com o decorrer do processo o compartimento onde o vinho é alimentado, perde os seus iões (catiões e aniões), sendo o seu conteúdo conhecido como diluato. Por sua vez, o compartimento enriquecido em iões é denominado por concentrado.

As vantagens que são atribuídas a este processo incluem, nomeadamente o facto da qualidade do vinho não ser alterada (Cameira dos Santos *et al.*, 2000; Moutounet *et al.*, 1997), as necessidades energéticas são menores, 0,2 a 0,5 kWh/m³, (Moutounet and Escudier, 1991) e o equipamento tem uma pequena pegada ecológica e pode ser automatizado, diminuindo a necessidade de mão de obra (Moutounet and Escudier, 1991). De acordo com, Moutounet and Escudier, 1991, as necessidades energéticas requeridas para a refrigeração do vinho são três vezes maiores do que os custos unitários de funcionamento de uma unidade de electrodiálise. Contudo, os custos associados às substituições das membranas e à manutenção do equipamento são desencorajadores do ponto de vista da adopção comercial deste processo.

5.1.3. Nanofiltração e Microfiltração

A NF é outra potencial tecnologia para estabilização tartárica. Por recurso a esta técnica, induz-se a cristalização por concentração do vinho, sem arrefecimento. Mannapperuma (2001) realizou um estudo em escala semi-piloto, onde usou a NF em combinação com a MF, para estabilizar o vinho tartaricamente.

A NF foi utilizada para concentrar o vinho, induzindo a precipitação dos cristais de KHT. Os cristais foram, posteriormente, removidos do concentrado de NF por MF. Numa última etapa, misturaram-se os permeados de NF e MF, de forma a reconstituir o vinho.

Segundo este autor, o tratamento de NF, com recurso à MF para separação dos cristais, permite uma redução de custos face ao tratamento pelo frio. Contudo, o facto do tratamento de NF/MF recorrer a pressões muito altas (até 60 bar), torna-o possivelmente um processo não favorável do ponto de vista económico. Além disso é de referir que, não foram divulgados dados experimentais que confirmem se a estabilidade tartárica foi atingida, assim como também não foram tidos em conta, os efeitos causados pelo tratamento, ao nível das características organolépticas do vinho.

Um estudo posterior desenvolvido por Colby (2007), demonstrou que a NF pode ser utilizada com sucesso na estabilização tartárica do vinho, tendo-se mostrado que tal pode ser alcançado a pressões de alimentação moderadas (<20 bar). Os tempo necessários para que ocorresse completamente a fase de cristalização, após os ensaios de concentração, foram relativamente curtos (< 3 h). Contudo a avaliação sensorial do vinho sujeito a NF revelou que este apresentava diferenças (negativas) face ao vinho bruto e também face ao vinho estabilizado tartaricamente pelo frio. As razões destas diferenças estão ainda a ser investigadas.

5.1.4. Permuta Iónica

A permuta iónica tem já uma história de aplicação na indústria vitivinícola para a estabilização tartárica, especialmente na América. O tratamento de estabilização tartárica por permuta iónica consiste em fazer passar o vinho por resinas catiónicas, que têm a capacidade de fixar Ca^{2+} e K^+ , substituindo-os por Na^+ e H^+ , reduzindo-se assim o estado de saturação do KHT e do CaT e consequentemente o risco de ocorrer cristalização e precipitação destes no vinho.

Contudo, este processo pode não ser considerado adequado em alguns vinhos, nos quais altos teores em sódio representam um motivo de preocupação.

Este processo pode colocar em causa a qualidade do vinho, por adsorção dos compostos responsáveis pela cor e sabor destes (Rankine, 2004). Além disso, os resíduos gerados pela regeneração da resina de troca iónica são altamente salinos. A eliminação separada destes resíduos pode ser cara e misturá-los com outros resíduos vinícolas pode aumentar o custo dos tratamentos e limitar as opções de eliminação. Todos estes factores têm limitado uma larga utilização deste processo (Colby, 2007).

5.2. Métodos Químicos

Os métodos químicos incluem compostos químicos que são adicionados ao vinho de forma a estabilizá-los tartaricamente, por inibição da cristalização. Entre estes compostos incluem-se: o ácido metatartárico, a carboximetilcelulose e as manoproteínas de leveduras,

- **Ácido metatartárico**

O ácido metatartárico é produzido através da formação de ligações éster entre os grupos hidroxilo e ácido do ácido tartárico (Jackson, 2008). A adição de ácido metatartárico aos vinhos é um método de estabilização tartárica económico e de curto prazo, dado que o ácido metatartárico é lentamente hidrolisado a ácido tartárico. Desta forma, a utilização deste aditivo é aconselhada em vinhos que se prevêem consumir pouco tempo depois de serem engarrafados. Quando adicionado ao vinho, o ácido metatartárico restringe a cristalização do bitartarato de potássio e interfere com o crescimento dos cristais de tartarato de cálcio.

O ácido metatartárico tem sido o inibidor mais usado na indústria vitivinícola. Contudo, a utilização deste ácido é desaconselhável uma vez que este despolimeriza-se com o tempo, libertando ácido tartárico que pode aumentar ainda mais os riscos de ocorrência de precipitação (Gonçalves, F., 2002).

- **Carboximetilcelulose (CMC) (ou goma de celulose)**

A CMC é mais estável do que o ácido metatartárico e é muito efectiva na inibição da precipitação tartárica. Na presença da CMC os cristais de bitartarato de potássio (KHT), crescem mais lentamente e sofrem uma alteração morfológica (Gerbaud, 1996). Estas alterações devem-se à competição entre as moléculas de CMC e os iões de bitartarato para se ligarem aos cristais de KHT (Crachereau *et al.* 2001).

O efeito da CMC na inibição da precipitação dos sais tartáricos pode ser explicado pela interacção da carga negativa da CMC com a carga positiva dos cristais (potássio e cálcio) (Crachereau *et al.* 2001). Tem contudo também sido discutido o facto de a CMC além de interagir com o tartarato também interagir com outros componentes do vinho. A adição de CMC aos vinhos tintos que apresentavam instabilidade tartárica demonstrou prevenir a formação de cristais de sal (Claus, H. *et al.* 2014).

Segundo Moutounet *et al.* 2010, a CMC além de ser menos efectiva nos vinhos tintos, interage com os polifenóis em geral e com as antocianinas em particular, gerando turbidez e causando uma alteração na cor.

Regulamentação: Tratamento permitido pela OIV em Junho de 2008 para os vinhos brancos e espumantes. Tratamento autorizado pela União Europeia em Agosto de 2009.

- **Manoproteínas de leveduras**

Como já se sabe, pelo que foi referido anteriormente neste trabalho, o vinho contém macromoléculas que agem como colóides protectores. Às concentrações em que estão presentes nos vinhos estas macromoléculas dificultam a cristalização tartárica, não a inibindo completamente.

As manoproteínas de leveduras revelaram ter um efeito inibidor na cristalização tartárica, o que conduziu ao desenvolvimento da preparação industrial, MannostabTM, purificada a partir de manoproteínas da parede de levedura. Esta preparação é um pó branco, perfeitamente solúvel, inodoro e sem sabor, que revelou prevenir a precipitação tartárica em amostras de vinho branco. Estas amostras, de vinho branco, foram retiradas antes do vinho ser estabilizado pelo frio e engarrafado. Esta preparação demonstrou inibir a cristalização do KHT, quando adicionada a concentrações compreendidas entre 15 e 25 g/hL (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A OIV (*Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*), no código internacional de práticas enológicas (2013), reconhece a utilização das manoproteínas de leveduras com o objectivo de melhorar a estabilidade do vinho, no que diz respeito às precipitações tartáricas.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

6. Parte Experimental

Antes de se descreverem os diferentes procedimentos experimentais adoptados na realização do presente trabalho, apresenta-se um diagrama (Figura 8) que visa esquematizar as principais etapas seguidas, de modo a alcançar o objectivo principal, ou seja o estudo da influência na precipitação do CaT de diferentes compostos numa solução modelo de vinho.

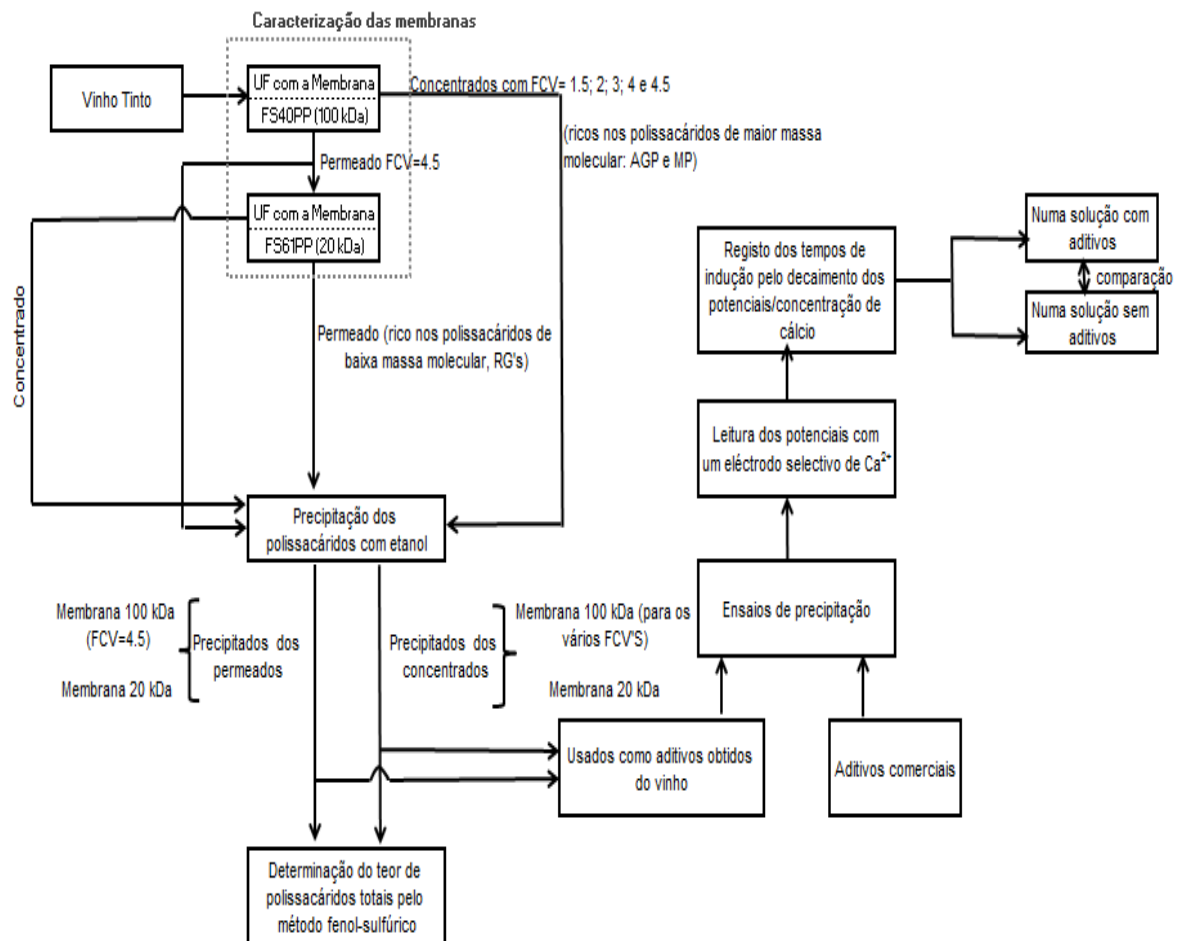


Figura 8. Diagrama que esquematiza as principais etapas do procedimento experimental adoptado no presente trabalho.

6.1. Vinho

O vinho tinto utilizado durante o presente trabalho foi produzido na Ex-Estação Vitivinícola Nacional, actual Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (Dois Portos, Portugal), por recurso a tecnologias de vinificação convencionais, tendo sido lá que se realizaram os métodos analíticos conducentes à caracterização físico-química do vinho (consultar secção 6.4.1.).

6.2. Ultrafiltração

Os ensaios de UF, com o vinho tinto, foram realizados na instalação Lab-Unit M20, da DSS (Figura 9). Esta instalação é muito versátil, permitindo realizar ensaios de MF, UF, NF ou OI, em modo descontinuo.

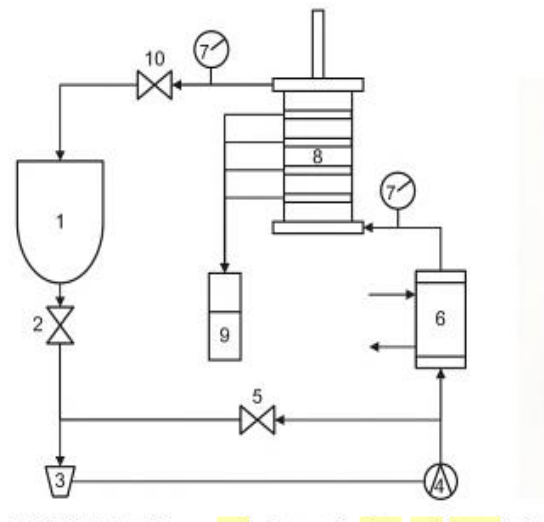


Figura 9. Fotografia e esquema da instalação Lab-Unit M20. 1. Tanque de alimentação; 2. Válvula; 3. Filtro de segurança; 4. Bomba de alta pressão; 5. Válvula de *by-pass* (ou de agulha); 6. Permutador de calor; 7. Manómetro; 8. Módulo de pratos planos ("*plate and frame*"); 9. Colector de permeado; 10. Válvula reguladora de pressão (Cui *et al.* 2010).

A configuração das membranas nesta instalação é do tipo *plate and frame*. Neste tipo de configuração as membranas são dispostas paralelamente sob um mesmo prato colector. Os diferentes pratos colectores estão separados entre si por espaçadores. Os espaçadores encontram-se divididos em canais, de modo a garantir um escoamento uniforme (Figura 10). Apesar de não se encontrar representado no esquema é importante mencionar que esta instalação contém uma bomba hidráulica manual, que é responsável pela compressão do módulo de pratos planos, garantindo a sua estanquicidade.

A área superficial de membrana total para esta instalação, segundo o catálogo do fabricante, pode variar entre 0,036 e 2 m². O número de pratos colectores utilizados e o conhecimento da área superficial útil de uma membrana, que neste caso, é 0,018 m², permite determinar a área superficial total de membrana utilizada. Assim, por exemplo, a utilização de 1 prato colector corresponde a uma área de membrana de 0,036 m² (área mínima).

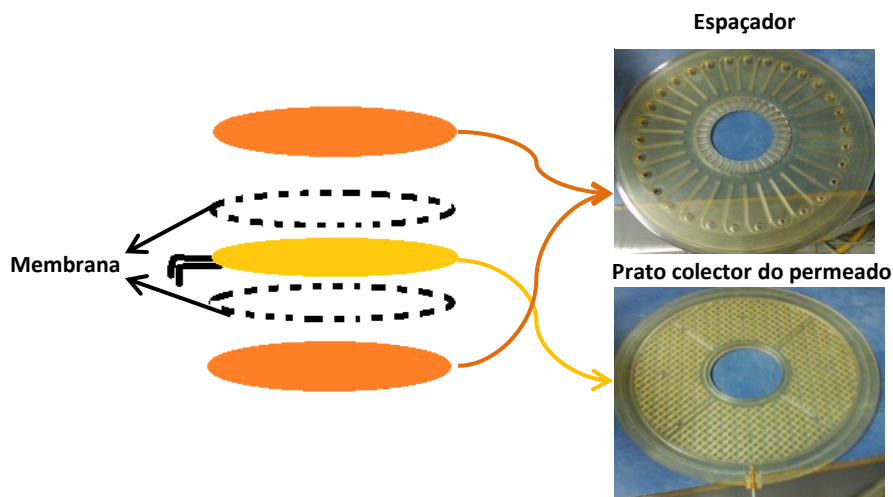


Figura 10. Esquema de montagem das membranas no módulo de pratos planos (Instalação Lab-Unit M20).
 À direita: Em cima imagem de um dos espaçadores usado no trabalho experimental e em baixo imagem de um prato coletor de permeado.

6.2.1. Procedimento de funcionamento da instalação

O procedimento de funcionamento da instalação envolve a realização de 4 etapas distintas (1. colocação da instalação em funcionamento; 2. estabilização das condições operatórias; 3. recolha do permeado e 4. paragem de operação).

A primeira etapa consiste em pôr a instalação operacional, sendo necessário confirmar que as **válvulas 5 e 10** (Figura 9) estão abertas. A **válvula 10** (válvula reguladora da pressão) deve estar parcialmente aberta, de modo a garantir uma pressão baixa, no módulo de membranas, aquando do início do funcionamento da instalação. A **válvula 5**, válvula de *by-pass*, nesta fase deve estar completamente aberta, de modo a que o caudal que inicialmente atravessa as membranas seja mínimo. Seguidamente, deve ligar-se a água de refrigeração e posteriormente a bomba. .

Após esta etapa, a **válvula 5** (válvula de *by-pass*) deve ser gradualmente fechada, de modo a ajustar o caudal de circulação para o valor pretendido. O fecho da válvula de *by-pass*, traduz-se num aumento do caudal de circulação, o que implica um aumento gradual da velocidade de circulação. O aumento da velocidade de circulação permite expulsar o ar existente nas tubagens e comprimir as membranas adequadamente contra os pratos de suporte (Figura 10). No caso do presente trabalho, operou-se ao caudal máximo de circulação (9 L/min), o que corresponde a manter esta válvula completamente fechada.

De seguida, deve ajustar-se a **válvula 10** (válvula reguladora de pressão), de modo a atingir-se o valor de pressão pretendido.

A segunda etapa consiste na estabilização das condições operatórias. Assim, nesta fase, opera-se em modo de recirculação total, isto é, o permeado é recirculado ao tanque de alimentação, durante um dado período de tempo, de modo a garantir a estabilização das condições operatórias do sistema (pressão, caudal de circulação, concentração do permeado e do concentrado).

É de referir que, durante os ensaios de UF com esta instalação, não se utilizou o tanque de alimentação que vinha incluído, dado que este era responsável por perdas de líquido da alimentação. Em vez desse tanque, utilizou-se assim, outro recipiente adequado.

Após a estabilização das condições operatórias é feita a recolha do permeado para uma proveta. Durante esta operação é registado o tempo, por recurso a um cronómetro. O fluxo de permeação, pode posteriormente, ser calculado pela expressão (7).

$$J_p = \frac{V_p}{A \times t} \quad (7)$$

Onde, J_p representa o fluxo de permeado ($L/m^2 \cdot s$); V_p é o volume de permeado recolhido (L); A é a área útil de membrana utilizada (m^2) e t é o tempo (s).

Por fim, para realizar a paragem da operação deve reduzir-se gradualmente a pressão do sistema, por abertura quase completa da **válvula 10** (Figura 9), e diminuir também lentamente o caudal de circulação, por abertura completa da **válvula 5** (Figura 9). Desliga-se então, primeiramente, o motor da bomba e depois fecha-se a água de refrigeração.

6.3. Membranas

Nos ensaios de UF usaram-se duas membranas orgânicas de fluoro polímero, da DSS (Dinamarca). A membrana FS40PP com um limite de exclusão molecular (MWCO ou “molecular weight cut-off”) de 100 kDa e a membrana FS61PP com um MWCO de 20 kDa.

Nos ensaios de UF com a membrana FS40PP usou-se uma área de membrana de $0,072 \text{ m}^2$, o que corresponde à utilização de 4 membranas com uma área unitária de $0,018 \text{ m}^2$. No caso dos ensaios de UF com a membrana FS61PP utilizou-se uma área de membrana de $0,036 \text{ m}^2$, correspondente à utilização de 2 membranas.

Após a montagem das membranas, no módulo, estas devem ser lavadas e, posteriormente, compactadas.

6.3.1. Lavagem das membranas

A lavagem das membranas foi feita em dois passos.

Inicialmente, num primeiro passo, as membranas foram lavadas, em modo de recirculação total, com água desionizada durante 1 hora, tendo a água circulado a baixas pressões (0,6 bar) e à velocidade de circulação máxima. Durante este passo, pretendem-se remover materiais de protecção que se encontram na superfície da membrana.

De seguida, as membranas foram lavadas com uma solução de hidróxido de sódio (98% fornecido pela Panreac) de $\text{pH} = 11$, durante 2 horas, em modo de recirculação total. No final deste período, o passo seguinte foi efectuar a lavagem das membranas com água desionizada, em modo de concentração, isto é, com saída de permeado de forma a remover o hidróxido de sódio. Este passo de lavagem considera-se completo quando o pH da água filtrada (permeado) iguala, ou se aproxima, do pH da água inicial.

Este procedimento de lavagem foi adoptado nos ensaios realizados com o intuito de caracterizar as membranas. Nos ensaios com o vinho tinto, repetiu-se o procedimento descrito anteriormente, sendo que a única diferença foi que a água desionizada utilizada para remover o hidróxido de sódio

foi aquecida até 50°C e circulou durante 30 minutos, em modo de recirculação total. Após este período, o permeado foi recolhido, tendo-se procedido da mesma forma que foi descrita anteriormente.

A lavagem das membranas foi feita de forma a assegurar os valores de pH, temperatura e pressões indicados pelo fabricante para os tipos de membranas utilizadas (Anexo 1). O procedimento de lavagem das membranas repete-se no fim de cada ensaio.

6.3.2. Compactação das membranas

A etapa de compactação consiste na permeação de água desionizada, em modo de recirculação total, durante um período compreendido entre 2 a 3 horas, a uma pressão 20% superior à pressão máxima de trabalho a usar nos ensaios posteriores com o vinho. A compactação visa a minimização de qualquer efeito na estrutura das membranas durante os ensaios posteriores. Se tal acontecesse poderia registar-se um decréscimo do fluxo de permeado.

6.3.3. Caracterização das membranas

Ambas as membranas foram caracterizadas em termos da permeabilidade hidráulica à água pura e do MWCO.

6.3.3.1. Determinação da permeabilidade hidráulica

O facto da permeabilidade hidráulica estar relacionada com as propriedades morfológicas da membrana, torna-a num parâmetro importante na caracterização de uma membrana. A permeabilidade hidráulica define-se como sendo a quantidade permeada por unidade de tempo, por unidade de área superficial e por unidade de pressão aplicada e corresponde ao declive da representação gráfica do fluxo de água pura (J_p) em função da pressão (ΔP).

A variação do fluxo com a pressão, é descrita pela equação (1), já anteriormente apresentada (consultar secção 3.2.2).

$$J_p = \frac{L_p}{\mu} \times \Delta P \quad (1)$$

Onde, $\frac{L_p}{\mu}$ corresponde à permeabilidade hidráulica da membrana.

6.3.3.2. Determinação do limite de exclusão molecular das membranas (MWCO)

MWCO, ou simplesmente *cut-off*, define-se como a massa molar (de um polímero de referência, frequentemente, o dextrano), que é 90-95% rejeitada pela membrana (Cui *et al.* 2010). Este parâmetro é usado na UF para caracterizar o tamanho do poro da membrana e é uma indicação da selectividade desta. A selectividade de uma membrana é geralmente expressa pela rejeição (f) a uma substância específica. A rejeição (f) é assim uma medida da capacidade de rejeição da membrana, relativamente a um soluto, e é dada pela equação (8):

$$f = \frac{C_a - C_p}{C_a} \quad (8)$$

Onde, C_a e C_p correspondem, respectivamente, às concentrações do soluto na alimentação e no permeado. Esta expressão corresponde, a uma rejeição “aparente”, pois C_a é uma medida da concentração no seio da alimentação/concentrado e não à superfície da membrana, o que simplifica os cálculos associados aos balanços de massa.

Os solutos de referência usados neste trabalho estão representados na tabela 5.

Tabela 5. Solutos de referência usados para a determinação do MWCO.

Solutos de Referência (Da)	Massas Moleculares Médias (Da)	Fórmula Química	Marca
Dextran T10 (10000)	9000-11000		
Dextran T40 (40000)	35000-45000	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Pharmacia
Dextran T70 (70000)	63000-77000		

As rejeições aos solutos orgânicos de referência, foram determinadas em termos do carbono orgânico total (COT) (Consultar secção 6.4.2), para as correntes de alimentação e de permeado. As rejeições a estes solutos de referência foram depois utilizadas na determinação do MWCO.

O MWCO corresponde à intercepção da recta obtida através da representação gráfica de $\log\left(\frac{f}{1-f}\right)$ em função da massa molecular dos solutos de referência, com a recta $\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = 1$, correspondente à massa molecular do soluto com uma rejeição de 90,9%.

6.3.4. Ensaios de UF com o vinho tinto

Antes de se realizarem os ensaios de UF com o vinho tinto, adicionou-se ao vinho metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) (96% fornecido pela Panreac), com o intuito de prevenir a sua oxidação durante os ensaios posteriores. A quantidade adicionada teve em consideração o regulamento CE 1493/99, que especifica que o limite legal para consumo humano directo, expresso em SO_2 , para vinhos tintos é de 160 mg/L.

6.3.4.1. Ensaios em modo de concentração

Nos ensaios em modo de concentração apenas o concentrado é recirculado ao tanque de alimentação, sendo o permeado colectado noutra tanque.

Os ensaios realizados em modo de concentração têm como objectivo, a obtenção de fracções, com diferentes factores de concentração volumétricos (FCV). Pretende-se posteriormente avaliar a influência que estas fracções têm na precipitação do tartarato de cálcio (CaT) (consultar secção 7.6.4). O factor de concentração volumétrico calcula-se, de acordo com a expressão (9).

$$FCV = \frac{V_i}{V_c} = \frac{V_i}{V_i - V_p} \quad (9)$$

Onde, V_i corresponde ao volume inicial da alimentação; V_c corresponde ao volume final de concentrado e V_p é o volume de permeado recolhido ao fim de um tempo t .

6.4. Métodos Analíticos

6.4.1. Caracterização físico-química do vinho

Os princípios em que assentam os métodos analíticos utilizados, na obtenção de cada um dos parâmetros, são descritos seguidamente. Nos casos em que os métodos não se encontram descritos pormenorizadamente, indica-se o regulamento europeu e as normas portuguesas onde estes podem ser consultados em detalhe.

Os parâmetros considerados na caracterização físico-química do vinho e os respectivos métodos usados na sua determinação foram os seguintes:

1. Teor alcoólico em volume (% v/v): corresponde ao número de litros de álcool etílico contido em 100 L de vinho, sendo estes dois volumes medidos à temperatura de 20 °C. O **método** usado para a sua determinação é o que **consta no regulamento CEE 2676/90 e na NP-2143**. Este método tem como princípio a destilação do vinho alcalinizado e a medição do teor alcoólico do destilado por areometria.

2. Massa volúmica no vazio a 20°C de um vinho corresponde, ao quociente entre a massa no vazio de um certo volume dessa bebida, à temperatura de 20°C, e esse volume. O **método** usado para a sua determinação é o que **consta no regulamento CEE 2676/90 e na NP-2142**. O princípio do método assenta na determinação da massa volúmica por areometria e na sua correcção em função da temperatura.

3. Açúcares redutores são, segundo a norma usada na determinação destes, o conjunto de açúcares com função aldeídica ou cetónica que lhes confere poder redutor sobre uma solução cupro-alcalina. O **método** usado nesta determinação é o que **consta no regulamento CEE 2676/90 e na NP-2223**. O princípio deste método assenta na defecação da bebida (quando necessária), seguida pela redução da solução cupro-alcalina e pela titulação do excesso de iões cúpricos por iodometria.

4. Extracto seco total de um vinho corresponde, segundo a OIV (Anónimo, 2014), ao conjunto de todas as substâncias que não se volatilizam, sob determinadas condições físicas. As condições físicas devem ser tais que os componentes desse extracto sofram o mínimo de alteração possível, enquanto o teste está a ser realizado. O **método** usado, método densimétrico, **consta no regulamento CEE nº 2676/90 e na NP-2222**. O extracto seco total é calculado indirectamente a partir do valor da densidade do "resíduo sem álcool" (vinho cujo álcool foi eliminado e cujo volume foi reconduzido ao valor inicial, com água) e a sua determinação é um dos principais elementos caracterizadores de um vinho e da sua genuinidade (Curvelo-Garcia, 1988).

5. Características cromáticas de um vinho dizem respeito à sua luminosidade e cromaticidade. A luminosidade corresponde à transmitância, e varia na razão inversa da intensidade corante do vinho. A cromaticidade corresponde ao comprimento de onda dominante, que caracteriza a tonalidade, e à pureza. As características cromáticas dos vinhos tintos são definidas pela intensidade

corante e pela tonalidade (“nuance”). Para a determinação das características cromáticas recorreu-se ao **método espectrofotométrico**. As absorvâncias são obtidas para diferentes comprimentos de onda (420, 520 e 620 nm) e para um percurso óptico de 1 cm. A **intensidade corante** resulta da soma dos valores das absorvâncias a estes três comprimentos de onda. A **tonalidade (“nuance”)** corresponde ao quociente entre o valor da absorvância a 420nm e o valor da absorvância a 520nm.

6. Dióxido de enxofre livre e total: O **dióxido de enxofre livre** diz respeito ao dióxido de enxofre que se encontra nas seguintes formas: H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^- . O dióxido de enxofre que se encontra em todas as outras formas, recebe a designação de **dióxido de enxofre combinado**. A soma do dióxido de enxofre livre e combinado resulta na obtenção do **dióxido de enxofre total**. O **método** usado nestas determinações é o que consta no regulamento **CEE 2676/90 e na NP-2220**. Por este método, o **dióxido de enxofre livre** é determinado por titulação iodométrica directa, enquanto que o **dióxido de enxofre combinado** é determinado por titulação iodométrica, após uma dupla hidrólise alcalina do vinho. O **dióxido de enxofre total** é a soma das duas determinações descritas anteriormente.

7. Acidez total define-se como, a acidez titulável a pH 7, por adição de uma solução alcalina titulada. O **método** usado para esta determinação, titulação colorimétrica, consta no regulamento **CEE 2676/90 e na NP-2139**. Este método consiste na neutralização dos ácidos por uma solução alcalina, na presença de um indicador adequado, por comparação com um padrão de cor.

8. Acidez volátil define-se como, a acidez que inclui os ácidos gordos da série acética que se encontram no vinho, tanto no estado livre, como na forma de sais. O **método** usado nesta determinação, titulação colorimétrica, consta no regulamento **CEE 2676/90 e na NP-2140** e consiste na separação dos ácidos voláteis por arrastamento numa corrente de vapor de água, seguida de rectificação, condensação e posterior titulação.

9. Pesquisa da fermentação maloláctica é realizada com o intuito de pesquisar os ácidos málico e láctico, isto é, os ácidos envolvidos na fermentação maloláctica. O **método** usado consiste em avaliar semi-quantitativamente a presença do ácido málico por cromatografia em papel. Assim, o teor de ácido DL- málico é avaliado pela comparação visual da intensidade e da dimensão da mancha, relativamente a soluções com teor conhecido (Curvelo-Garcia, 1988).

10. Índice de polifenóis totais: O princípio do método utilizado na determinação deste parâmetro, assenta no facto dos vinhos tintos absorverem o máximo de radiação UV a 280 nm, o que se deve principalmente à absorção dos núcleos benzénicos, característicos dos compostos fenólicos (Curvelo-Garcia, 1988). No método analítico usado, método espectrofotométrico, procede-se primeiramente à diluição da amostra de vinho tinto em água, numa razão de 1:100, lendo-se de seguida o valor de absorvância a 280 nm, recorrendo a um espectrofotómetro, sob 1 cm de percurso óptico. A leitura de absorvância é feita relativamente a uma amostra preparada apenas com água. O índice de polifenóis totais é obtido multiplicando, posteriormente, a absorvância lida pelo factor de diluição (Curvelo-Garcia, 1988).

6.4.2. Determinação do carbono orgânico total (COT)

As medições do COT foram feitas num analisador de carbono DC-85A (Dohrmann, Santa Clara, CA, USA), calibrado com uma solução de hidrogenoftalato de potássio (2000 ppm de carbono). Este aparelho é composto por três unidades: um forno, um detector de infravermelho e um integrador.

Para proceder à análise das amostras, injectam-se 40 µL da amostra no forno. Nesta etapa, ocorre a conversão de todo o carbono orgânico em CO₂. O CO₂ segue depois para o detector de infravermelho. O sinal enviado pelo detector é depois processado pelo integrador.

O COT de cada amostra é, por fim, obtido por subtracção do valor de COT lido, para a amostra, pelo valor de COT lido para o branco. O branco é preparado com a água desionizada utilizada na preparação das amostras.

6.4.3. Isolamento dos polissacáridos totais existentes no vinho e nas fracções obtidas por UF

O método de isolamento mais frequentemente usado baseia-se na precipitação dos polissacáridos, por recurso a um solvente orgânico (etanol). A separação do precipitado é feita por centrifugação, e posteriormente, este é lavado com álcool.

O método analítico utilizado, proposto por Segarra *et al.* (1995), encontra-se descrito em Gonçalves, F. (2002) e consiste nas seguintes etapas:

- Primeiramente coloca-se directamente no copo da centrífuga (B. Braun Sigma 4K10) vinho e etanol, na proporção de 1:5, respectivamente. Isto é a 4 mL de vinho adicionam-se 20 mL de etanol.
- A solução é colocada num banho termostatizado (Huber, polystat cc2) a 5° C, durante 12 h, sendo de seguida centrifugada durante 15 min (8000 rpm). O precipitado obtido é lavado com 10 mL de etanol (96% (v/v) da Manuel Vieira & Cia) e esta mistura é centrifugada durante 15 min (8000 rpm).
- O precipitado é depois seco à temperatura ambiente e sob vácuo durante um período superior a 24 h.

6.4.4. Determinação do teor de polissacáridos pelo método fenol-sulfúrico

Parte dos polissacáridos precipitados, obtidos durante a etapa descrita anteriormente (6.4.3), são dissolvidos em 4 mL de água. Para aplicação do método fenol-sulfúrico dilui-se a solução aquosa de polissacáridos de 1:10 (F. Gonçalves, 2002; Segarra *et al.*, 1995).

A aplicação do método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) baseou-se então em, adicionar a cada tubo de ensaio: 0,4 mL da solução aquosa de polissacáridos, 0,4 mL de fenol 5% (em peso) (≥ 99% fornecido pela Merck) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (95-97% da Sigma Aldrich). O conteúdo de cada tubo é depois agitado e após um período de 40 minutos procede-se à leitura das absorvâncias num espectrofotómetro (Shidmazu UV modelo UV-1700, com células de quartzo com um percurso óptico de 1 cm). As leituras são feitas relativamente a um branco preparado com 0,4 mL de água, 0,4 mL de fenol e 2 mL de ácido sulfúrico.

As absorvâncias lidas permitem obter o teor de polissacáridos totais, através de uma recta de calibração previamente traçada usando a glucose (fornecida pela Panreac).

6.5. Ensaio de precipitação

Os ensaios de precipitação consistiram em avaliar os tempos de indução, do tartarato de cálcio, numa solução modelo com e sem aditivos. A montagem experimental que foi usada nos ensaios compreendeu três partes: um reactor de parede dupla com uma capacidade de aproximadamente 250 mL, um medidor de pH (micropH 2002 Crison) e um potenciómetro (Crison 2002), ao qual se encontram ligados o eléctrodo selectivo aos iões de cálcio (Crison Modelo 96 60) e o eléctrodo de referência de prata/cloreto de prata (Metrohm 6.0733.100) (Figura 11). Durante os ensaios, o medidor de pH e os eléctrodos foram montados numa tampa de borracha, tal como é possível observar na figura 11 e as leituras foram efectuadas continuamente. A agitação durante os ensaios de precipitação é mantida a 850 rpm, e é garantida por uma placa de agitação (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) e por uma barra de agitação magnética revestida em teflon. Os ensaios foram realizados a uma temperatura constante e igual a 15°C. A manutenção da temperatura foi assegurada por um banho termostaticado (Huber, polystat cc2), com etilenoglicol, associado ao reactor. O etilenoglicol circula entre as paredes duplas do reactor.

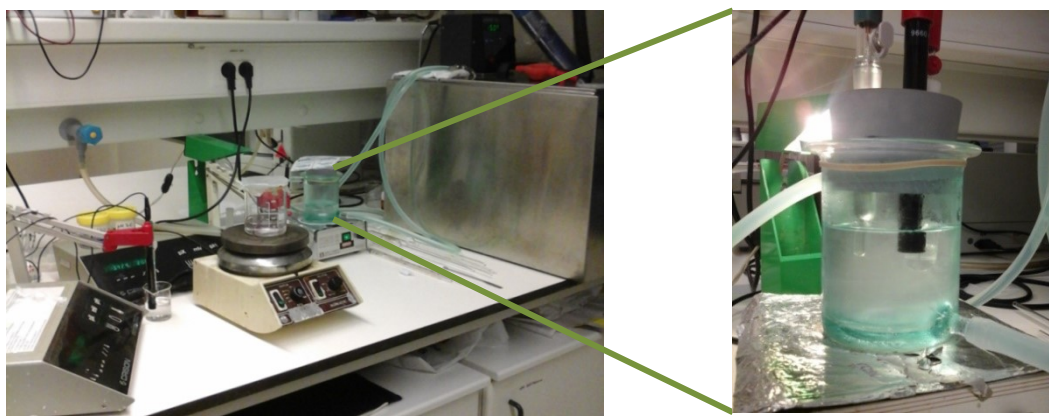


Figura 11. Montagem experimental.

Nos ensaios de precipitação utilizou-se uma solução modelo hidroalcoólica, contendo 11% (v/v) de etanol (96% (v/v) da Manuel Vieira & Cia), L(+)- ácido tartárico (fornecido pela Merck p.a) e cloreto de cálcio di-hidratado (fornecido pela Merck p.a). A solução modelo visa reproduzir as características encontradas no vinho, tais como o teor alcoólico, a força iónica e o pH.

Com os ensaios realizados com a solução modelo, com e sem aditivos, pretende-se testar o tempo de indução associado à precipitação do CaT. Considerou-se o tempo de indução como sendo o instante em que se registou o primeiro decréscimo no valor de potencial lido no potenciómetro, ao qual se encontra ligado o eléctrodo selectivo aos iões de cálcio. A um valor menor de potencial corresponde uma menor concentração de cálcio ionizado, pelo que conseqüentemente se pode inferir que o tempo de indução corresponde ao primeiro decréscimo na concentração de cálcio ionizado. Além do recurso ao eléctrodo selectivo, os tempos de indução foram também avaliados visualmente,

através do início da turvação. O recurso a ambos os métodos é concordante, dado que o início da turvação, isto é, quando se inicia a precipitação do CaT, se traduziu numa alteração imediata no valor do potencial lido pelo eléctrodo.

A solução modelo resulta da mistura entre as duas soluções hidroalcoólicas, a de ácido tartárico e a de cloreto de cálcio di-hidratado, de modo a obter uma solução com uma concentração final de 2,2 g/L (0,0143 M) em ácido tartárico e 140 mg/L (0,0035 M) em cálcio. A proporção entre as concentrações, de cálcio e de ácido tartárico, está de acordo com o apresentado em McKinnon *et al.* 1995.

Adicionaram-se volumes iguais destas duas soluções, por forma a obter uma solução modelo com um volume final de 140 mL e com as concentrações pretendidas. Desta forma, em cada um dos ensaios, pipetou-se 70 mL da solução hidroalcoólica de cloreto de cálcio di-hidratado para o interior do reactor, mantido à temperatura de 15°C. Posteriormente, pipetou-se 70 mL da solução hidroalcoólica de ácido tartárico para um gobelé de 250 mL (Simax).

Nesta fase, e antes de se misturarem as duas soluções, procedeu-se ao ajuste da força iónica e à aferição do pH. Sendo a força iónica calculada por aproximação através da expressão:

$$\text{Força Iónica} = \frac{(\sum_{i=1}^n C_i Z_i^2)}{2} \quad (10)$$

Onde, C_i representa a concentração molar de um dado ião e Z_i representa a respectiva carga desse ião.

A força iónica da solução modelo foi ajustada a 0,038 M, valor este que se encontra dentro da gama de forças iónicas (0,016 e 0,056) consideradas por Berg e Keefer (1958, 1959) para os vinhos. O ajuste foi feito através da adição de cloreto de sódio 4 M (fornecido pela Analar Normapur) à solução hidroalcoólica de cálcio, contida no interior do reactor sob agitação (850 rpm).

De seguida, o pH das duas soluções hidroalcoólicas foi aferido a 3,5, através da adição de HCl 0,1 M (37 % fornecido pela Panreac) ou de hidróxido de sódio 5 M (98 % fornecido pela Panreac). Contudo, antes disso, procedeu-se à calibração do medidor de pH, por recurso a uma solução padrão de pH 4 e a uma solução padrão de pH 7, seguindo os passos indicados no manual do aparelho. Durante a aferição do pH, a solução hidroalcoólica de ácido tartárico foi colocada sob agitação, por recurso a uma outra placa de agitação (Agimatic) e a uma outra barra magnética (Figura 11). Com a agitação garante-se uma melhor homogeneização da solução, o que conduz a uma estabilização mais rápida do pH.

Nos ensaios com aditivos a adição destes foi feita à solução de ácido tartárico, de modo a evitar que ocorresse a ligação do aditivo ao cálcio, antes das duas soluções serem misturadas. Também nesta fase, se torna importante garantir a agitação desta solução, por forma a facilitar a dissolução do aditivo.

Por fim, a solução de ácido tartárico contida no gobelé é transferida para o interior do reactor, onde a solução de cálcio, se encontrava sobre agitação (a 850 rpm).

Para converter os valores de potenciais lidos, em concentrações de cálcio, traçou-se uma recta de calibração com concentrações de cálcio total entre 10^{-4} a 10^{-3} M e de ácido tartárico, entre 10^{-3} e 10^{-2}

M, de forma a manter a proporção entre o cálcio e o ácido tartárico, considerada durante os ensaios. A recta de calibração foi traçada, seguindo o mesmo procedimento que foi anteriormente descrito para a solução modelo. No anexo 4B apresentam-se todas as curvas de calibração que foram construídas ao longo do trabalho, por forma a testar a influência da presença de ácido tartárico e do valor da força motriz. As três curvas de calibração podem ser representadas por uma única recta se o potencial for representado em termos da actividade do ião Ca^{2+} . A actividade deste ião foi determinada, por aproximação, com recurso ao software *MinTeq*. A utilização deste software, que determina as várias espécies em solução, permitiu também verificar que ao pH de 3,5, o Ca^{2+} representa cerca de 60% do cálcio total. Tal está de acordo com os valores de concentração inicial de cálcio ionizado obtidos por McKinnon *et al.* (1995).

Todas as soluções usadas nos ensaios de precipitação foram preparadas com água desionizada Millipore.

As curvas de precipitação, apresentadas para os ensaios, são obtidas pela representação gráfica do potencial em função do tempo. As leituras dos potenciais e do pH são iniciadas, assim que se misturam as duas soluções. Porém, as representações gráficas apresentadas, na secção 7.6, apenas consideram os valores lidos ao fim de 8 minutos. Apenas, ao fim deste período de tempo se garante uma correcta homogeneização entre as duas soluções e se assegura a estabilização da temperatura nos 15°C. A temperatura, a força iónica e o pH têm influência nos valores de potencial lidos.

Na tabela 6 estão discriminados todos os aditivos utilizados nos ensaios de precipitação e as respectivas marcas.

Tabela 6. Aditivos utilizados nos ensaios de precipitação e respectivas marcas.

Reagentes usados como aditivos	Pureza e Marca	Reagentes usados como aditivos	Pureza e Marca
Ácido cítrico	≥ 99,5 %, da Panreac	Ácido gálico	Fornecido pela Sigma
L (+)-Ácido láctico	88-92 %, da Panreac	Ácido salicílico	≥ 99 %, Aldrich
DL-Ácido málico	Fornecido pela BDH	Ácido adípico	99 %, Sigma
Tartarato de cálcio	Fornecido pela Sigma	Ácido trans-cinâmico	> 99 %, Fluka
D-Ácido galacturónico	98 % da Panreac	Ácido benzóico	> 99,5 %, Panreac
L(+)-Arabinose	99 %,Sigma	L-Ácido glutâmico	≥ 99 %, Sigma
L- Ramnose	99 %,Sigma	L-Ácido aspártico	≥ 98 %, Sigma
Dihidrogenofosfato de amónio	Fornecido pela Merck p.a.	L-Treonina	≥ 98 %, Sigma
Ácido hidroxibenzóico	>98 %, Merck	L-Serina	≥ 99 %, Sigma
Ácido vanílico	Fornecido pela Sigma	Glicina	≥ 99 %, da Sigma
Ácido p-coumárico	98 %, Aldrich	Agár	Fornecido pela BDH Chemicals
Ácido 2-clorobenzóico	99 %, Merck-Schuchardt	Ácido glucónico	99 %, da BDH
		Ácido metatartárico	Fornecido pela Merck

7. Resultados e Discussão

7.1. Caracterização físico-química do vinho

A caracterização físico-química do vinho tinto utilizado neste trabalho foi realizada no INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária), em Dois Portos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Caracterização físico-química do vinho tinto.

Título alcoométrico volúmico (% v/v)		12.1
Massa volúmica (g/mL a 20 °C)		0.9929
Extracto seco total (g/L)		27.53
Características Cromáticas (420, 520 e 620 nm)	Intensidade	8.947
	Tonalidade (“nuance”)	0.636
Índice de polifenóis totais		50.25
Teor de dióxido de enxofre livre (mg de SO ₂ /L)		5
Teor de dióxido de enxofre total (mg de SO ₂ /L)		100
Acidez Total (g de ácido tartárico/L)		6.0
Acidez volátil (g de ácido acético/L)		0.47
pH		3.28
Açúcares redutores (g/L)		1.9
Pesquisa de fermentação maloláctica		Positivo/Negativo

Da análise de todas as características apresentadas na tabela 7, pode concluir-se que o vinho usado neste trabalho, é um vinho tinto típico. Quanto à pesquisa maloláctica (ver anexo 2) prevê-se, pelos resultados obtidos por cromatografia em papel, que a fermentação maloláctica terá tido início, não tendo sido ainda terminada. Nestes casos em que a fermentação maloláctica não ocorreu até ao fim é aconselhável a adição de anidrido sulfuroso (SO₂), vulgarmente conhecido por sulfuroso, para garantir que a fermentação maloláctica, que ocorre por acção de bactérias lácticas, não se dê após o vinho já estar engarrafado. A adição de sulfuroso foi feita em duas fases distintas do trabalho. Numa primeira fase este foi adicionado, no INIAV, de forma a evitar o que foi atrás referido. Numa segunda fase, e com o intuito de evitar a oxidação do vinho decorrente da sua passagem pela instalação de membranas, este foi adicionado ao vinho depois do desengarrafamento.

7.2. Caracterização das membranas

7.2.1. Determinação da permeabilidade hidráulica

Ambas as membranas foram caracterizadas em termos da permeabilidade hidráulica à água pura. A determinação da permeabilidade hidráulica foi feita considerando os fluxos de permeação da água desionizada a diferentes pressões, compreendidas entre 1 e 3,5 bar. Estes ensaios foram realizados ao caudal máximo de circulação (9 L/min) e a uma temperatura entre 20-21°C.

O cálculo dos fluxos de permeação envolve o conhecimento da área superficial de cada membrana. No caso da membrana FS40PP utilizou-se uma área superficial de $0,072 \text{ m}^2$ e para a membrana FS61PP a área superficial usada foi de $0,036 \text{ m}^2$.

As representações gráficas conducentes à obtenção das permeabilidades hidráulicas das membranas FS40PP e FS61PP são apresentadas abaixo (Figura 12), sendo que a permeabilidade hidráulica corresponde ao declive destas rectas, com ordenada na origem nula (equação 1).

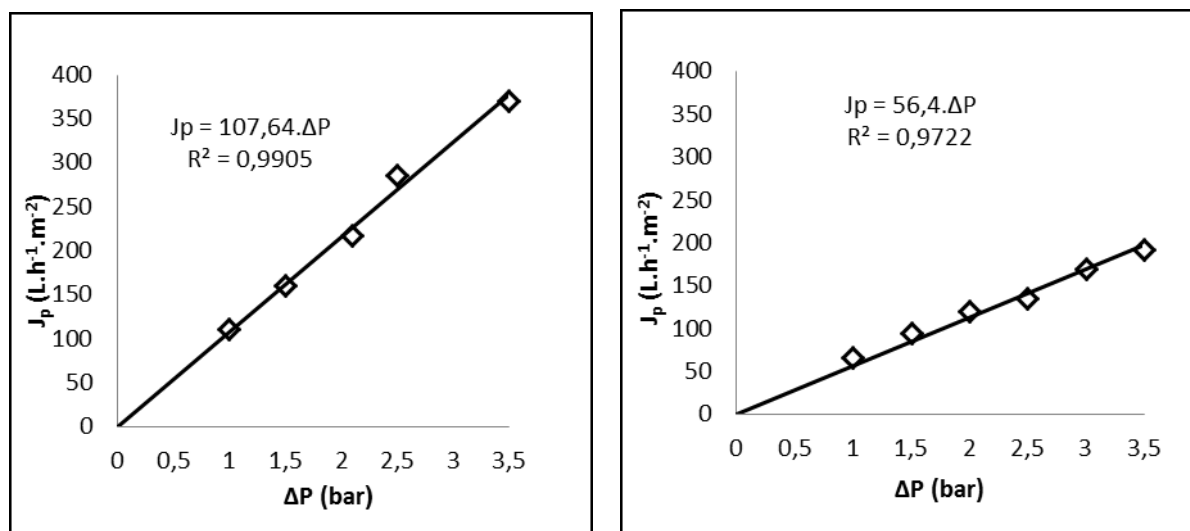


Figura 12. Representação do fluxo de permeação da água desionizada em função da pressão para as membranas: FS40PP (à esquerda) e FS61PP (à direita).

Desta forma, obtém-se que a permeabilidade hidráulica da membrana FS40PP é de $108 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$ e a da membrana FS61PP é de $56 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$.

7.2.2. Determinação do limite de exclusão molécula (MWCO)

Para caracterizar as membranas usadas neste trabalho, relativamente ao MWCO procedeu-se à permeação de soluções de solutos de referência, neste caso, os dextranos.

A concentração de dextranos usada nestes ensaios de permeação foi de 500 mg/L . Os ensaios de UF com este soluto de referência foram realizados a uma pressão de 1 bar , à temperatura de 20°C e ao caudal máximo de recirculação (9 L/min). As condições operatórias utilizadas e o facto de se utilizarem soluções diluídas, visam minimizar ou mesmo eliminar quaisquer problemas de polarização da concentração.

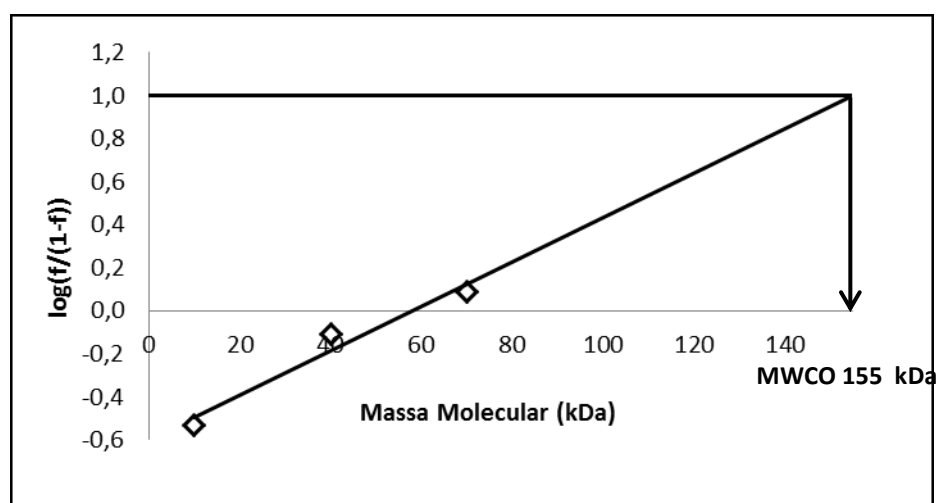
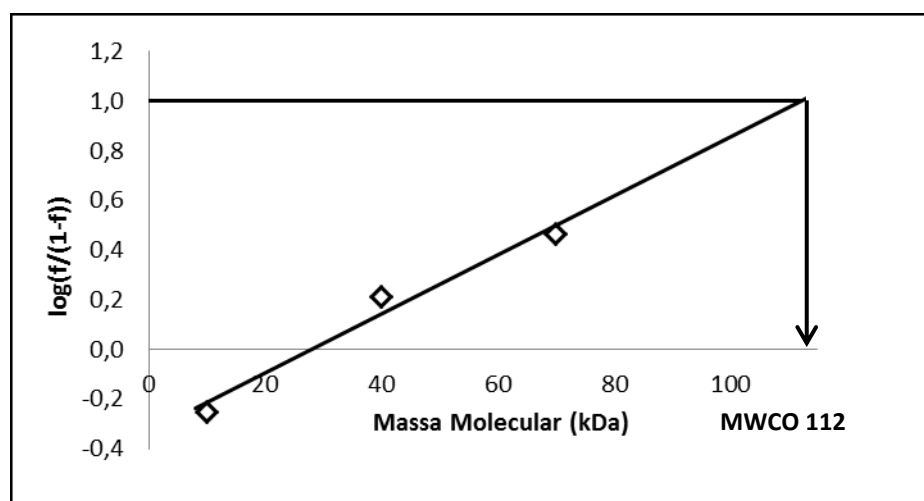
Após cada ensaio com as soluções de solutos de referência, as membranas foram lavadas com água desionizada. Nesta fase, os fluxos de água foram determinados, de modo a verificar se tinha ocorrido algum problema de colmatção.

Os limites de exclusão molecular foram, posteriormente, calculados com base nos factores de rejeição aparente (f), obtidos experimentalmente por medições do carbono orgânico total às soluções de alimentação e ao permeado, resultantes do ensaio de UF. Os factores de rejeição obtidos, para as duas membranas, são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Factores de rejeição obtidos experimentalmente para as duas membranas usadas no presente trabalho.

Soluto de Referência	Massa Molecular (kDa)	Rejeição aparente (f)	
		Membrana FS40PP	Membrana FS61PP
Dextran T10	10	0,36	0,23
Dextran T40	40	0,62	0,44
Dextran T70	70	0,74	0,55

As representações gráficas de $\log\left(\frac{f}{1-f}\right)$ em função da massa molecular dos solutos de referência, para as duas membranas utilizadas, são apresentadas nas figuras 13a (para a membrana FS40PP) e 13b (para a membrana FS61PP). A obtenção do MWCO resulta da intersecção desta representação com a recta $\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = 1$.



Figuras 13. a) Obtenção do limite de exclusão molecular para a membrana FS40PP (primeira figura); b. Obtenção do limite de exclusão molecular para a membrana FS61PP (segunda figura).

O limite de exclusão molecular obtido experimentalmente para a membrana FS40PP, 112 kDa, encontra-se próximo do valor indicado pelo fabricante (100 kDa).

Contudo, o mesmo não acontece com a membrana FS61PP. Para esta membrana, o valor indicado pelo fabricante é de 20 kDa e o valor obtido da caracterização desta é de 155 kDa. O grande desfasamento entre estes dois valores pode ser indicativo de que a membrana, em causa, está danificada. Ou pode dever-se a outros factores, tais como, eventuais erros na obtenção das concentrações aquando das medições do carbono orgânico total ou da utilização de condições ou métodos experimentais diferentes dos que foram usados pelo fabricante na sua determinação.

Tendo em conta, as duas últimas razões apresentadas, optou-se por, considerar as indicações fornecidas pelo fabricante, e usar esta membrana nos ensaios de UF posteriores, de modo a realizar um dos objectivos de interesse do presente trabalho (consultar secção 6 - diagrama do procedimento experimental).

7.3. Ensaio de UF com o vinho tinto

Antes do início dos ensaios em modo de concentração com a membrana FS40PP (100 kDa), estudou-se de que forma é que o fluxo varia com o aumento da pressão, tendo-se verificado que a variação deste é linear até valores de pressão de 1 bar. Para pressões entre 1,5 bar e 2 bar, o aumento dos fluxos ocorre de forma mais gradual, parecendo retomar o comportamento linear para as pressões de 2,5 e 3 bar (Figura 14).

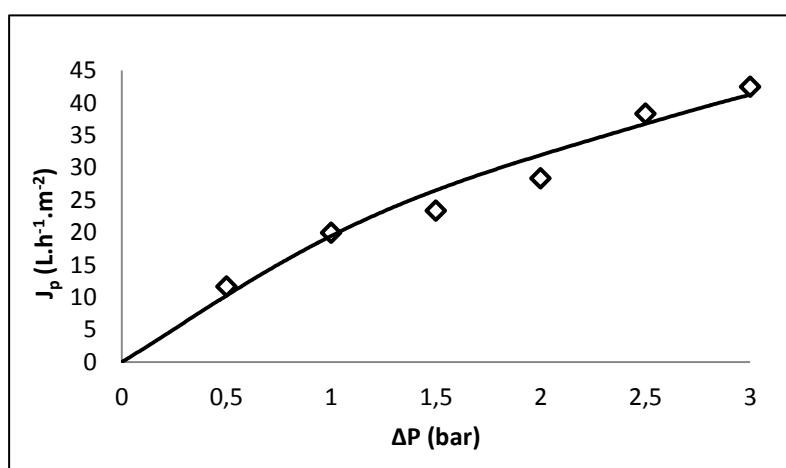


Figura 14. Variação do fluxo de permeação do vinho tinto com a pressão. Membrana: FS40PP; Condições operatórias: $T=20^{\circ}C$, ao caudal máximo de circulação (9L/min); Área superficial de membrana de $0,072 m^2$.

Os fluxos obtidos por UF do vinho tinto são muito menores do que os obtidos com o vinho branco (De Pinho, M.N, 2010). Gonçalves *et al.* (2001), usando a mesma membrana considerada no presente trabalho (membrana FS40PP), e variando a pressão entre cerca de 0,8 e 2,5 bar, ao caudal máximo de circulação, obteve fluxos de permeação para o vinho branco entre 125 e $275 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$, respectivamente. Os fluxos de permeação do vinho tinto, usando a mesma membrana e ao mesmo caudal de circulação, demonstraram ser menores (Gonçalves *et al.*, 2002). Assim, variando a pressão entre cerca de 0,8 e 2,6 bar, este autor obteve fluxos de permeação para o vinho tinto entre cerca de 25 e $50 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$.

Os fluxos obtidos para o vinho tinto no presente trabalho (Figura 14), utilizando a mesma membrana, foram semelhantes aos obtidos por este autor. Para pressões entre 0,5 e 3 bar obtiveram-

se fluxos de 12 e 42 L.h⁻¹.m⁻². Os valores de fluxos podem variar consoante o tipo de vinho tinto que está a ser utilizado. Assim, a diferença entre os valores obtidos por este autor e os obtidos no presente trabalho podem dever-se a possíveis diferenças de composição resultantes, por exemplo, de diferentes técnicas de vinificação.

Nos ensaios posteriores, em modo de concentração, optou-se por trabalhar a uma pressão de 3 bar, dado que a esta pressão estão associados maiores fluxos de permeação. Além disso, até esta pressão, não se verifica uma tendência de estabilização do fluxo, o que permite observar que, nestas condições, não ocorrem problemas de colmatação da membrana, que possam colocar em causa o seu normal funcionamento.

7.3.1. Ensaio em modo de concentração com a membrana FS40PP conducentes à obtenção das fracções com diferentes FCV a usar nos ensaios de precipitação.

A fim de testar a influência que fracções com diferentes FCV têm na inibição da precipitação do CaT, procedeu-se, nesta fase à realização de ensaios em modo de concentração. A operação em modo de concentração consiste em, tal como foi referido anteriormente neste trabalho, recircular a alimentação ao tanque de alimentação, sendo o permeado continuamente colectado (numa proveta). Este modo de operação conduz, desta forma, a uma alteração na composição da alimentação.

Assim, quanto maior for o FCV maior será a concentração dos compostos rejeitados, isto é, os que têm uma massa molecular superior a 100 kDa, na alimentação. As AGP e as MP são os polissacáridos do vinho que se enquadram nesta situação (consultar tabela 2). Os polissacáridos de menor peso molecular, como as RG's (I e II), são permeados.

Para a realização dos cinco ensaios (correspondentes aos FCV=1,5; 2; 3; 4 e 4,5), utilizaram-se diferentes volumes iniciais de alimentação. No total, utilizou-se um volume de vinho de 18 L.

Na figura 15 representa-se graficamente a variação do fluxo de permeação com o FCV.

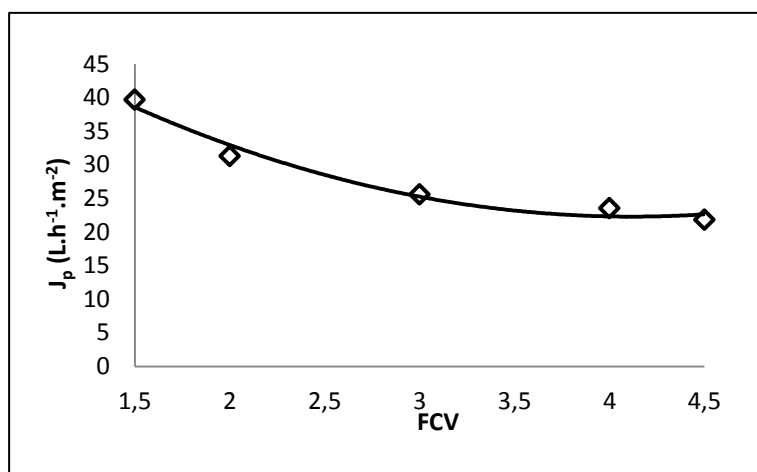


Figura 15. Variação do fluxo de permeação com o FCV, para a obtenção de concentrados de polissacáridos. Membrana: FS40PP (100 KDa); Condições operatórias: T=20°C, P=3 bar e caudal de circulação máximo (9 L/min); Área superficial da membrana de 0,072 m².

Conforme se pode observar pela figura 15, o aumento do FCV, até 4.5, traduz-se numa diminuição dos fluxos de permeação. Esta diminuição vai sendo, progressivamente, menos acentuada a partir do FCV de 3.

Assim, para os FCV's de 4 e 4,5, os fluxos de permeado são de 23,5 e 21,8 L.h⁻¹.m⁻², respectivamente, o que corresponde a uma variação entre estes valores de 7,2%. A variação dos fluxos é mais acentuada, 21,1%, para os FCV de 1,5 e 2, onde os fluxos de permeação são de 39,7 e 31,3 L.h⁻¹.m⁻², respectivamente. Esta diminuição de fluxos com o aumento do FCV é devida a fenómenos de polarização da concentração e/ou colmatação da membrana.

7.4. Ensaio de UF com o permeado obtido pela membrana FS40PP

A fase seguinte consistiu na utilização da membrana com menor *cut-off*, membrana FS61PP (20 kDa), de modo a obter um permeado mais rico nos polissacáridos de menor peso molecular, como a RG-II.

Para alcançar este objectivo, realizou-se um ensaio em modo de concentração, tendo-se optado por trabalhar com o permeado, resultante dos ensaios anteriores com a membrana FS40PP, correspondente ao maior FCV (4,5), dado que, tal como já foi referido, quanto maior o FCV maior é a concentração dos polissacáridos de maior massa molecular na alimentação. Consequentemente, e tal como se pretende, obtém-se um permeado mais rico nos polissacáridos de menor peso molecular.

Neste ensaio utilizou-se, como alimentação, cerca de 3,2 L de permeado (FCV = 4,5), o qual foi concentrado até um FCV de 2,5. A representação gráfica do fluxo em função do FCV, para esta situação, apresenta um comportamento semelhante ao que foi descrito anteriormente, para a membrana FS40PP, e é apresentada na figura 16. Adoptaram-se as mesmas condições operatórias consideradas nos ensaios descritos anteriormente na secção 7.3.1.

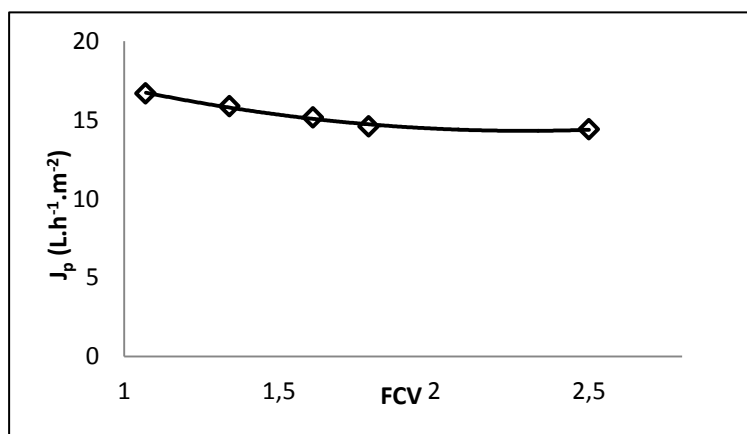


Figura 16. Variação do fluxo de permeação com o FCV. Membrana: FS61PP (20 KDa); Condições operatórias: T=20°C, P=3 bar e caudal de circulação máximo (9 L/min); Área superficial da membrana de 0,036 m².

7.5. Isolamento dos polissacáridos presentes no vinho tinto e nas fracções obtidas por UF com as membranas FS40PP e FS61PP. Determinação do teor de polissacáridos totais de cada uma das fracções.

Após obtidas as diferentes fracções por UF, procedeu-se ao isolamento dos polissacáridos contidos em cada uma delas. O isolamento dos polissacáridos foi feito por precipitação com etanol, seguindo o procedimento descrito em 6.4.3.

Os precipitados obtidos nesta etapa serão utilizados, posteriormente, nos ensaios de precipitação e no método fenol-sulfúrico, usado para determinar o teor de polissacáridos totais. Os polissacáridos do vinho tinto foram também isolados, com o intuito de calcular a taxa de remoção dos polissacáridos pela membrana FS40PP.

Na tabela 9 indicam-se os volumes de amostras (vinho tinto, concentrados ou permeados) utilizadas no procedimento de precipitação com etanol, bem como a massa de precipitado obtida para cada situação e a massa usada para a determinação dos polissacáridos totais, pelo método fenol-sulfúrico.

Tabela 9. Volume de amostra utilizada no procedimento de precipitação com etanol, massa de precipitado obtida por este procedimento e massa de precipitado usada na determinação dos polissacáridos totais.

Amostra		Volume usado nos ensaios (mL)	Massa de precipitado obtida (g)	Massa usada na determinação dos polissacáridos (g) (Volume correspondente em mL)	
Vinho Tinto		80	0,0304	0,0038 g (10 mL)	
Membrana FS40PP	Concentrados	FCV=1,5	80	0,0874	0,0109 g (10 mL)
		FCV=2	80	0,1279	0,01599 g (10 mL)
		FCV=3	60	0,1551	0,01939 g (7,5 mL)
		FCV=4	80	0,2176	0,0272 g (10 mL)
		FCV=4,5	80	0,4405	0,0551 g (10 mL)
	Permeado	FCV=4,5	140	0,0309	0,0022 g (10 mL)
Membrana FS61PP	Concentrado	FCV=2,5	80	0,0344	0,0043 g (10 mL)
	Permeado	FCV=2,5	80	0,025	0,00313 g (10 mL)

Observa-se pela tabela anterior, para a membrana FS40PP, que quanto maior é o FCV dos concentrados maior é a massa de precipitado obtida por precipitação com etanol, tal como seria espectável. Relativamente aos concentrados e permeados, resultantes dos ensaios de UF com as duas membranas, observa-se que se obtém uma maior massa de precipitado para os concentrados do que para os permeados, tal como também seria de esperar.

Na figura 17, estão representados os permeados e os concentrados, nos respectivos copos da centrífuga, durante o procedimento de precipitação com etanol. Para cada caso, é possível observar a diferente gradação de cor entre o permeado e o concentrado.

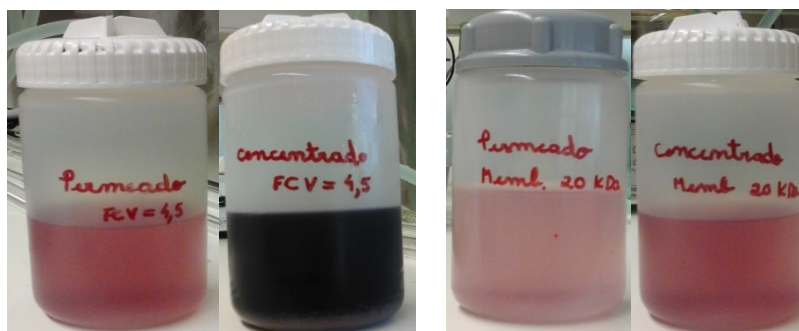


Figura 17. Permeados e concentrados resultantes da UF, com as duas membranas, durante o procedimento de precipitação com etanol.

De seguida, procedeu-se à determinação do teor de polissacáridos em cada uma destas fracções, utilizando uma massa de precipitado correspondente a 10 mL de amostra. Estas quantidades estão apresentadas na tabela 9.

O método usado nesta determinação foi o método-fenol sulfúrico (consultar secção 6.4.4). Nesta fase traçou-se uma recta de calibração para a glucose. Esta relaciona a absorvância com a concentração (ver anexo 3).

As concentrações de polissacáridos totais obtidas, por este método, estão representadas na tabela 10.

Tabela 10. Teor de polissacáridos totais no vinho tinto inicial, nos concentrados e nos permeados obtidos por UF.

Amostra		Polissacáridos totais em cada fracção (mg/L)
Vinho Tinto inicial		327,2
Membrana FS40PP (100 kDa)	Conc. FCV=1,5	363,2
	Conc. FCV=2	425,3
	Conc. FCV=3	425,3
	Conc. FCV=4	434,8
	Conc. FCV=4,5	434,8
	Perm. FCV=4,5	83,3
Membrana FS61PP (20 kDa)	Permeado FCV=2,5	38,8
	Concentrado FCV=2,5	91,9

Observa-se pela tabela 10, que o teor de polissacáridos totais nos concentrados tem tendência a aumentar com o factor de concentração volumétrico, o que também foi observável durante a realização do método colorimétrico fenol-sulfúrico. Neste método, a reacção entre os polissacáridos e o fenol, na presença de um ácido, origina compostos com uma coloração amarelo-acastanhada, sendo a mudança de cor da amostra proporcional à quantidade de açúcares presentes nesta (Figura 18).

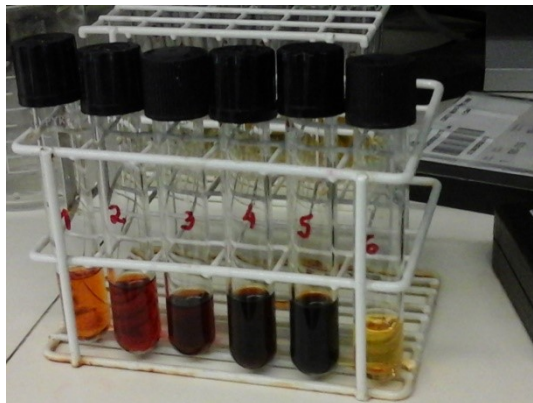


Figura 18. Gradação de cor das amostras durante a realização do método fenol-sulfúrico. Legenda: 1. Concentrado com FCV=1,5; 2. Concentrado com FCV=2; 3. Concentrado com FCV=3; 4. Concentrado com FCV= 4; 5. Concentrado com FCV= 4,5 e 6. Permeado com FCV= 4,5.

A variação do teor de polissacáridos das fracções de concentrado, em relação ao vinho tinto inicial, é menor do que a que se regista para o permeado.

De facto, verifica-se que se obtêm menores teores de polissacáridos totais no permeado, com a membrana FS40PP, quando comparados com o vinho tinto inicial. A taxa de remoção de polissacáridos obtida para este caso é de 75%. Gonçalves, F., (2002) obtém taxas de remoção de polissacáridos que chegam a ultrapassar os 90%, utilizando a mesma membrana.

Maiores taxas de remoção de polissacáridos conduzem à obtenção de um vinho mais deficitário em macromoléculas, o que conseqüentemente se traduz numa alteração de determinadas características organolépticas do vinho como, por exemplo, a cor (Figura 17).

7.6. Ensaio de precipitação

7.6.1. Avaliação da estabilidade tartárica de diferentes soluções modelo

Numa fase inicial, avaliaram-se os tempos de indução da precipitação do CaT em três soluções modelo hidroalcoólicas, contendo 11%(v/v) de etanol, e com diferentes concentrações de cálcio e de ácido tartárico.

Tomaram-se como referência as concentrações de cálcio, indicadas para o vinho branco (>80 mg/L) e tinto (>60 mg/L), a partir das quais podem começar a existir problemas associados à ocorrência de depósitos tartáricos (consultar secção 2.2.1). Assim, nas três soluções modelo estudadas consideraram-se concentrações de cálcio crescentes e iguais a 90, 140 e 250 mg/L, sendo as concentrações de ácido tartárico correspondentes de, respectivamente, 1,4, 2,2 e 3,9 g/L. A proporção entre as concentrações molares de cálcio e ácido tartárico foi estabelecida de modo a estar de acordo com o considerado por McKinnon *et al.* (1995).

Todos estes ensaios foram realizados à temperatura de 15°C, tendo o pH de cada solução sido, inicialmente, ajustado a 3,5. Apresenta-se no Anexo 5 a evolução simultânea do potencial e do pH, com e sem ajuste de pH, e uma possível explicação para o aumento do potencial inicial.

A força iónica foi acertada a cerca de 0,03 M, em cada uma destas soluções, através da adição de cloreto de sódio 4 M.

O volume de ajustador de força iónica, v , que é necessário adicionar, por forma a garantir a força iónica pretendida, resulta da aplicação da equação 10 e é dada por:

$$FI = \frac{1}{2} \times \left([Ca^{2+}] \times Z_{Ca^{2+}}^2 + 2 \times [Cl^-] \times Z_{Cl^-}^2 + [HT^-] \times Z_{HT^-}^2 + [T^{2-}] \times Z_{T^{2-}}^2 + \frac{[Na^+] \times v \times Z_{Na^+}^2 + [Cl^-] \times v \times Z_{Cl^-}^2}{V_T} \right)$$

Onde, [] representam as concentrações molares das várias espécies iónicas em solução e V_T é o volume total da solução modelo (140 mL).

As espécies iónicas $[HT^-]$ e $[T^{2-}]$ resultam dos dois balanços de dissociação do ácido tartárico (H_2T) apresentados na subsecção 4.1.2.1. As concentrações de $[H_2T]$ e $[HT^-]$ em equilíbrio, dependem do pH e são dadas por (Lasanta e Gómez, 2012):

$$[H_2T] = \frac{c}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}} \quad (11)$$

$$[HT^-] = \frac{c}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (12)$$

Onde, c é a concentração molar total de ácido tartárico. K_1 e K_2 são as constantes termodinâmicas de dissociação do ácido tartárico, sendo as respectivas expressões, em função da temperatura (em Kelvin), dadas por (Bates *et al.* 1951):

$$-\log K_1 = \frac{1525,59}{T} - 6,6558 + 0,015336T \quad (13)$$

$$-\log K_2 = \frac{1765,35}{T} - 6,6558 + 0,019276T \quad (14)$$

A concentração do ião tartarato (T^{2-}) pode posteriormente ser obtida pela equação (15). Esta resulta do balanço global às espécies iónicas envolvidas no equilíbrio de dissociação do ácido tartárico e é dada por:

$$[T^{2-}] = c - [H_2T] - [HT^-] \quad (15)$$

Na aplicação da equação (10), assumiram-se os seguintes pressupostos: 1) a dissociação do cloreto de cálcio di-hidratado é completa; 2) as constantes termodinâmicas, K_1 e K_2 , aplicam-se à dissociação do ácido tartárico numa solução aquosa de etanol a 11% (v/v) e para forças iónicas entre 0,016 e 0,056 M.

Como foi referido anteriormente (secção 4.1.2), a estabilidade tartárica de um vinho pode ser avaliada por recurso ao método do produto de concentração (PC). O produto de concentração pode considerar-se equivalente ao “produto de solubilidade” ao qual ocorrerá precipitação do sal no vinho (Colby, 2007). O produto de concentração do CaT é dado por: $PC = [T^{2-}]_r [Ca^{2+}]_r$, como se

apresentou anteriormente (subsecção 4.1.2.1), em que $[T^{2-}]$ e $[Ca^{2+}]$, são respectivamente as concentrações molares dos iões tartarato e cálcio.

De Soto *et al.* (1963), indicam os valores recomendados de PC para o CaT em vinhos estáveis. Para o vinho branco o PC_{CaT} recomendado é de $2 \times 10^{-6} M^2$ e para o vinho tinto é de $4 \times 10^{-6} M^2$.

Na tabela 11 apresentam-se os tempos de indução obtidos para cada uma das soluções modelo experimentadas, assim como também o respectivo valor de PC calculado. A concentração do ião tartarato (T^{2-}), utilizada no cálculo do PC, foi obtida pela equação 15 e considerando, as constantes termodinâmicas K_1 e K_2 dadas por (13) e (14). Estas constantes têm em conta a temperatura, mas não consideram o solvente (etanol) nem a força iónica usada nos ensaios. Assume-se esta aproximação como válida dado que, as soluções modelo contêm apenas 11% (v/v) de etanol e se trabalha com uma força iónica baixa.

Tabela 11. Tempos de indução obtidos e valores do PC calculados para cada uma das soluções modelo consideradas. Condições operatórias: T=15° C; velocidade de agitação=850 rpm; força iónica 0,038 M . O pH médio registado até ao instante em que se inicia a precipitação.

Concentrações molares e (mássicas) das diferentes soluções modelo		Concentração T^{2-} (M)	pH médio até ao momento em que se inicia a precipitação	Tempo de Indução	PC (M^2)
[Ca ²⁺]	0,006 (250 mg/L)	0,0023	3,50	3 min	1,38E-05
[Ácido tartárico]	0,026 (3,89 g/L)				
[Ca ²⁺]	0,0035 (140 mg/L)	0,0013	3,57	13 min	4,43E-06
[Ácido tartárico]	0,0140 (2,15 g/L)				
[Ca ²⁺]	0,0023 (90 mg/L)	0,0008	3,50	> 1 h	1,83E-06
[Ácido tartárico]	0,009 (1,36 g/L)				

Verifica-se, por análise da tabela 11, que não ocorreu precipitação do CaT, na solução modelo com menor concentração de cálcio (90 mg/L) durante o tempo em que decorreu o ensaio (1 h).

A concentração de ácido tartárico segue sempre a mesma proporção, relativamente à concentração de cálcio, em todas as soluções modelo analisadas.

Observa-se que à medida que se aumenta a concentração em cálcio, o tempo de indução, que corresponde ao instante em que se inicia a precipitação do CaT, diminui.

O método do PC demonstrou ser um método útil na avaliação da estabilidade tartárica de cada solução modelo. Tendo-se verificado que, para as soluções em que ocorreu precipitação, os valores de PC calculados são superiores aos valores tidos como referência para o vinho (tinto e branco), atrás enunciados. Tal indica que estas soluções poderão ser mais instáveis no que diz respeito à precipitação deste sal. Constata-se aliás, que quanto maior é o valor do PC mais rapidamente se inicia a precipitação, isto é, menor é o tempo de indução.

Na situação em que o PC_{CaT} ($1,83 \times 10^{-6} M^2$) é menor do que os valores de referência, é menos provável que se formem cristais de CaT, o que se verificou, dado que durante o tempo em que decorreu o ensaio, não ocorreu precipitação do CaT.

Este método não é recomendado quando se adicionam produtos, como por exemplo, o ácido metatartárico ou manoproteínas (Smith, 2012). Tal deve-se ao facto destes produtos, assim como,

outros compostos existentes no vinho, afectarem os equilíbrios e inibirem o crescimento dos cristais de KHT e CaT (Lasanta e Gómez, 2012).

Para os ensaios de precipitação posteriores, com aditivos, considerou-se a solução modelo com concentrações em cálcio e ácido tartárico de, respectivamente, 140 mg/L e 2,2 g/L. Nesta situação, a concentração de ácido tartárico encontra-se mais próxima do valor médio encontrado no vinho, além disso, o facto do tempo de indução para este caso ser maior (13 min) favorece a estabilização das condições operatórias, como a temperatura e a força iónica, que afectam os valores de potencial lidos e permite uma melhor homogeneização da solução aquando da adição dos aditivos. Se se considerasse a solução modelo para a qual o tempo de indução é de 3 min, poderia incorrer-se na possibilidade da precipitação ocorrer antes do aditivo ter tempo para, eventualmente, se ligar aos iões de cálcio ou afectar os equilíbrios envolvidos.

7.6.2. Efeito da temperatura na precipitação do CaT considerando a solução modelo a usar nos ensaios com aditivos

Nesta fase, e antes de se iniciarem os ensaios com aditivos avaliou-se o efeito da temperatura na precipitação do CaT. Os ensaios foram realizados às temperaturas de -4 e 5°C, usando a solução modelo que irá ser posteriormente considerada nos ensaios com aditivos. Os tempos de indução, obtidos para cada uma destas temperaturas, foram comparados com o tempo de indução obtido usando a mesma solução modelo à temperatura de 15 °C (consultar tabela 12).

Na tabela 12, são apresentados os tempos de indução obtidos para as diferentes temperaturas, bem como o pH médio registado até ao momento em que se inicia o decaimento dos potenciais, isto é, em que se inicia a precipitação.

Tabela 12. Tempos de indução obtidos para as diferentes temperaturas e pH médio registado até ao início da precipitação.

**Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: [Ca²⁺]=140 mg/L e [Ácido tartárico]=2,2 g/L.
Condições operatórias: velocidade de agitação=850 rpm; Força iónica 0,038 M.**

Temperatura (°C)	pH_{médio} registado até ao início da precipitação	Tempo de indução (min)
-4	3,81	12
5	3,65	13
15	3,57	13

Com base na tabela 12, o efeito da temperatura na precipitação do CaT não é muito visível, uma vez que os pH médios registados nos diferentes ensaios diferem entre si. No entanto, tal como se mencionou anteriormente (consultar secção 4.1.2.3) a precipitação do CaT não é tão dependente da temperatura como é do pH. O pH tem uma grande influência na precipitação do CaT, tal como já se referiu anteriormente. Um aumento do pH está associado a uma maior percentagem do ião T²⁻, em

solução (Figura 6), e como tal este estará mais disponível para se ligar ao cálcio e formar o CaT, o que pode conduzir a um aumento da probabilidade de ocorrer precipitação deste sal.

No entanto, como os tempos de indução não foram obtidos para os mesmos valores de pH, não se pode concluir acerca do efeito da temperatura, dado que não se consegue saber qual dos dois parâmetros foi mais determinante. Por exemplo, o facto de se obter um menor tempo de indução, para a temperatura de -4°C , pode não ser o resultado da baixa temperatura, mas sim dos maiores valores de pH registados durante este ensaio. É de referir que, após a mistura das duas soluções de trabalho (ambas previamente aferidas a um pH de 3,5), se registou um aumento do pH. Nesta fase, adicionaram-se pequenas quantidades de HCL 0,1 M de modo a ajustar o pH novamente a 3,5, tendo-se verificado que, os valores de pH não sofriam uma alteração significativa com esta adição. Este aumento de pH aquando da mistura das duas soluções pode ser indicativo que algum dos equilíbrios em causa, nomeadamente os do ácido tartárico, sejam influenciados pelas diferentes temperaturas.

7.6.3. Ensaio de precipitação para avaliar a influência de diferentes aditivos na precipitação do CaT

Nesta fase, por forma a alcançar o objectivo principal do presente trabalho, estudou-se a influência que diferentes aditivos têm na precipitação do CaT. Optou-se por testar aditivos pertencentes a diferentes classes de compostos, de modo a averiguar se existe alguma característica a nível da estrutura ou da composição química que possa estar associada à inibição da precipitação do CaT.

Grande parte dos aditivos testados, correspondem a compostos que estão presentes naturalmente nos vinhos. Pretende-se com estes ensaios entender de que modo é que cada um destes compostos influencia a precipitação do CaT. Além destes compostos, avaliaram-se também outros compostos que não se encontram presentes nos vinhos.

Durante a etapa de apresentação dos resultados, será feita referência aos vários aditivos considerados, às respectivas concentrações, em que cada um deles foi usado, bem como também ao(s) motivo(s) que determinaram a sua escolha.

Na figura 19, podem observar-se as representações gráficas do potencial e da concentração de cálcio, em função do tempo, para a solução modelo sem aditivos. Os potenciais foram convertidos na concentração de cálcio, usando a recta de calibração apresentada no anexo 4A.

Através da figura 19 é possível observar quando é que o decaimento do potencial e da concentração de cálcio têm início. O instante para o qual isso acontece equivale ao tempo de indução associado à precipitação do CaT. O tempo de indução obtido para a solução modelo foi de 13 min, tal como já tinha sido apresentado anteriormente.

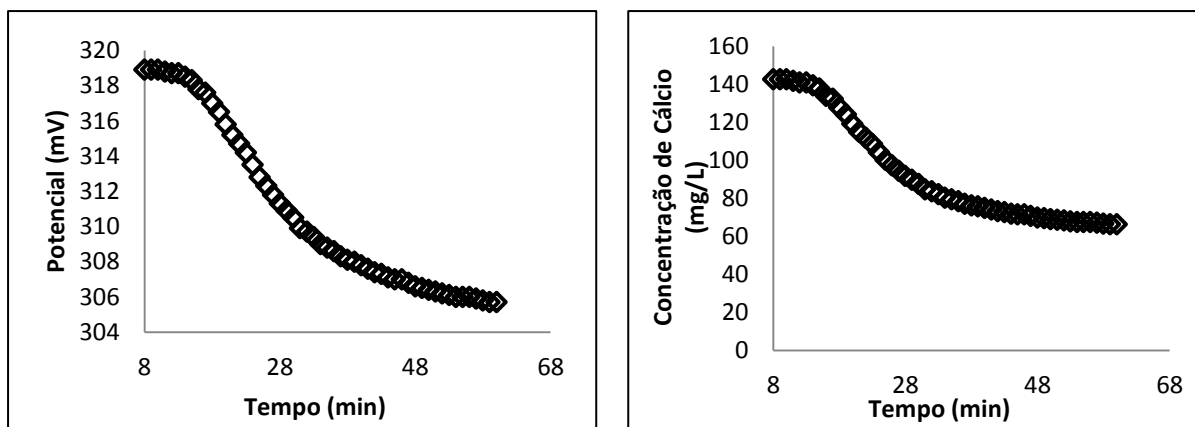


Figura 19. Representação gráfica do potencial (à esquerda) e da concentração de cálcio (à direita) em função do tempo. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$. Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; Força iónica 0,038 M; $\text{pH}_{\text{médio}}$ até ao início da precipitação = 3,58.

O ensaio com a solução modelo foi realizado duas vezes, tendo-se obtido o mesmo tempo de indução nas duas situações.

Observou-se contudo, que os valores de potenciais lidos diferiram nos dois ensaios. A única condição operatória que oscilou, aquando da mistura das duas soluções, foi o pH, que deve justificar a diferente resposta inicial do eléctrodo. Na tabela 13, indicam-se os tempos de indução, os pH ao fim de dois minutos e os respectivos valores de potenciais lidos a esses valores de pH, para as duas situações. Indica-se também o valor de $\text{pH}_{\text{médio}}$ de cada ensaio e o valor de potencial obtido pela curva de calibração a partir da actividade do Ca^{2+} , estimada pelo software *MinTeq*, para cada pH.

Tabela 13. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$. Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; Força iónica 0,038 M.

Solução	Tempo de indução (min)	$\text{pH}_{2\text{min}}$	Potencial _{2min} (mV)	$\text{pH}_{\text{médio}}$ ao fim de 60 min (duração do ensaio)	Potencial _{2min} estimado (mV)
Solução modelo sem aditivo 1 (Fig.19)	13**	3,614	317,8	3,496	315,9
Solução modelo sem aditivo 2 (repetição)	13**	3,481	320,8	3,452	317,2

** A análise por difracção de raios X, realizada para esta situação, demonstrou que o precipitado se trata de CaT.

Nos ensaios com os aditivos, optou-se por representar os potenciais em função do tempo, ao invés da concentração de cálcio. Caso contrário, poder-se-iam obter concentrações de cálcio que não traduziriam a realidade.

O tempo de indução permite avaliar a importância que um dado aditivo tem na fase de nucleação. Contudo, o efeito de um aditivo pode também ser avaliado face à influência que este exerce na velocidade de crescimento dos cristais. Com este intuito, determinaram-se dois parâmetros diferentes, sendo que ambos foram obtidos de modo a poder comparar o efeito que a adição de um

dado aditivo revela ter na velocidade de crescimento de cristais, quando comparada com a solução modelo sem aditivo.

Os dois parâmetros considerados foram o declive da representação gráfica do potencial em função do tempo (m_1) e a constante “cinética de crescimento” dos cristais (K'_G).

O declive m_1 foi obtido considerando a maior variação dos potenciais com o tempo, o que ocorre, após a nucleação e corresponde ao período, durante o qual os cristais estão a crescer a maior velocidade.

Calculou-se também a constante “cinética de crescimento” dos cristais, K'_G , que corresponde ao declive da representação gráfica de $-\ln(1-\alpha)$ em função do tempo t , como se representa na equação 16.

$$-\ln(1 - \alpha) = K'_G \cdot t \quad (16)$$

Em que α é dado por:

$$\alpha = \frac{P_0 - P(t)}{P_0 - P_{eq}}$$

Onde, P_0 diz respeito ao valor de potencial correspondente ao patamar registado antes do início da precipitação; $P(t)$ corresponde ao potencial num dado tempo, t e P_{eq} corresponde ao valor de potencial registado, quando se atinge um novo patamar de equilíbrio.

É importante referir que embora, estes parâmetros não sejam verdadeiras velocidades cinéticas para o crescimento dos cristais, estes podem servir como uma boa indicação da velocidade de crescimento dos cristais e podem ser utilizados para comparar os vários ensaios (com adição de diferentes aditivos). No anexo 7 apresentam-se os valores destes dois parâmetros, determinados para todos os ensaios realizados (sem e com aditivos).

Nesta fase, e por forma a avaliar se existe uma concordância ou proximidade entre os valores obtidos para estes dois parâmetros, determinou-se cada um deles para duas situações realizadas nas mesmas condições operatórias e considerando a mesma solução modelo. Na tabela 14, apresentam-se os valores médios obtidos para cada um destes parâmetros e a percentagem de variação entre os dois valores obtidos para cada caso.

Tabela 14. Valores médios do declive do potencial em função do tempo (m_1) e da constante “cinética de crescimento” dos cristais (K'_G), para os dois ensaios realizados com a solução modelo sem aditivo. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^\circ C$; velocidade de agitação = 850 rpm; Força iónica = 0,038 M.

Solução	Tempo de indução (min)	m_1 médio (% de variação)	K'_G médio (% de variação)
Solução modelo		-0,393	0,081
sem aditivo	13		
Média: (n=2)		(18,8 %)	(20,4%)

A variação entre os valores obtidos para estes dois parâmetros não é muito significativa e é possível que se deva às oscilações de pH registadas durante cada uma das experiências e à influência que estas variações possam ter nos potenciais registados. De qualquer forma, apenas dois pontos não são suficientes para avaliar se os valores obtidos são ou não uma boa aproximação para as referidas constantes, isto é, a obtenção de mais pontos permitiria retirar conclusões mais precisas.

7.6.3.1. Influência da adição de sementes de CaT na precipitação deste sal

Nesta fase estudou-se qual o efeito da adição de CaT no tempo de indução, na velocidade de decaimento do potencial (m_1) e na constante de crescimento dos cristais (K'_G).

Os valores de m_1 e K_G foram determinados para a solução com aditivo, e comparados com os valores médios obtidos para a solução modelo sem aditivo. Os resultados estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Efeito da adição de CaT no tempo de indução (TI), no decaimento do potencial em função do tempo (m_1) e na constante cinética de crescimento dos cristais (K_G).
Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e [Ácido tartárico]=2,2 g/L.
Condições operatórias: T=15°C; velocidade de agitação=850 rpm; pH_{médio} indicado abaixo.

	pH _{médio}	TI (min)	m_1 médio (% de variação)	K'_G médio (% de variação)
Solução modelo sem aditivo (n=2)	3,496	13	-0,393 (18,8 %)	0,081 (20,4%)
Solução modelo com 0,33 g/L de CaT (n=2)	3,450	7	-0,807 (9,42%)	0,134 (23,7%)

Uma vez que a fase limitante da precipitação do CaT é a nucleação primária, ao adicionarem-se cristais de CaT vence-se a barreira da energia de activação e é de esperar que o processo seja acelerado por ocorrência de nucleação secundária. De facto, e tal como era expectável, verifica-se uma diminuição no tempo de indução para a solução modelo com adição de CaT.

A adição de CaT à solução modelo traduz-se num decaimento mais acentuado do potencial (indicado pelo sinal negativo de m_1) e na obtenção de um valor de K_G superior. A variação registada no valor de K'_G , para as duas situações que consideram a adição de cristais de CaT, deve-se possivelmente ao facto do tempo de duração das duas experiências não ter sido igual, sendo que para uma delas ainda não se tinha atingido o patamar de equilíbrio, o que influencia o valor de K'_G obtido.

A variação entre os valores de m_1 e de K'_G para a solução modelo com CaT, relativamente à solução modelo sem aditivo, é de, respectivamente, 51,3 e 39,6%.

7.6.3.2. Influência da adição de diferentes aditivos comerciais na precipitação do CaT

O efeito inibidor de um dado aditivo foi avaliado por comparação dos tempos de indução obtidos para a solução modelo com e sem esse aditivo.

A adição do aditivo pode, em alguns casos, conduzir a uma alteração no valor de força iónica calculado para a solução modelo inicial. Como o eléctrodo selectivo aos iões de cálcio é sensível a variações de força iónica, é importante determinar o valor de força iónica (equação 10) para os ensaios com os diferentes aditivos. Além disso, e tal como foi mencionado na secção 4.1.2.3., a força iónica influencia a velocidade de cristalização.

As constantes de dissociação consideradas para cada aditivo aplicam-se a soluções aquosas diluídas e à temperatura de 25°C. Fez-se esta aproximação, uma vez que se desconhecem os valores destas constantes para as condições de trabalho (solução aquosa 11%(v/v) de etanol e T=15°C). As constantes de dissociação consideradas por McKinnon *et al.* (1995), para o ácido málico, foram determinadas utilizando uma solução hidroalcoólica, sendo os respectivos valores de: $K_1 \sim 2,40 \times 10^{-4}$ e $K_2 \sim 5,01 \times 10^{-6}$. A percentagem de variação entre estes valores e os considerados são de 31 e 37 %, respectivamente. Pode-se considerar que, para esta situação, a aproximação feita não se afasta muito da realidade.

As constantes de dissociação consideradas para cada aditivo e o respectivo valor de força iónica calculado, estão apresentados no anexo 6.

Os resultados dos vários ensaios de precipitação apresentam-se, de seguida, divididos por classes de compostos (ácidos orgânicos; ácidos fenólicos; açúcares; aminoácidos). Os compostos que não se integram em nenhuma das classes referidas, anteriormente, serão apresentados numa fase posterior.

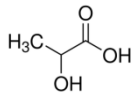
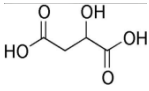
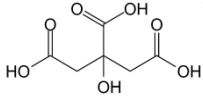
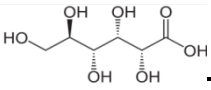
7.6.3.2.1. Ácidos orgânicos

- **Ácidos orgânicos que fazem parte da constituição do vinho**

Nesta fase, estudou-se a influência de diferentes ácidos orgânicos no tempo de indução do CaT. Na tabela 16, apresentam-se os resultados referentes aos ensaios realizados com os ácidos orgânicos presentes no vinho. Estes foram usados na gama de concentrações médias em que se encontram no vinho (consultar tabela 1). Para o ácido cítrico testaram-se concentrações superiores de modo a poder comparar, nas mesmas condições, o efeito deste ácido com outros ácidos orgânicos.

Os ácidos láctico, málico e cítrico incluem-se entre os principais ácidos orgânicos presentes no vinho. A importância que estes desempenham como inibidores da precipitação de CaT foi identificada em trabalhos anteriores realizados por McKinnon *et al.* (1995).

Tabela 16. Efeito dos ácidos orgânicos existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT .
 Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$.
 Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; $\text{pH}_{\text{médio}}$ e força iônica (FI) indicados abaixo.

Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	$\text{pH}_{\text{médio}}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)		
		TI (min)	FI (M)	
Solução modelo	0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com ácido láctico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 90,08 \text{ g/mol}$)		3,543	15	0,046
		(0,026 M)		
		3,478	15	0,046
	3,1 g/L (0,035 M)	3,538 (1,4%)	18	0,049
Solução modelo com ácido málico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 134,09 \text{ g/mol}$)		3,487	26	0,044
		(0,01 M)		
	3 g/L (0,02 M)	3,497 (2,5%)	93	0,050
Solução modelo com ácido cítrico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 210,14 \text{ g/mol}$)		3,536	15	0,039
		(0,0013 M)		
		3,496	27	0,044
	3,8 g/L ** (0,02 M)	3,553 (0,9%)	67	0,054
Solução modelo com ácido glucónico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 218,4 \text{ g/mol}$)		3,581*	>107	0,040
		(0,005 M)		
	2 g/L (0,009 M)	3,573* (0,39%)	>162	0,041

*O $\text{pH}_{\text{médio}}$ para estas duas situações corresponde ao $\text{pH}_{\text{médio}}$ do ensaio.

** A análise por difracção de raios X, realizada para esta situação, demonstrou que o precipitado se trata de CaT.

Durante os ensaios ocorrem flutuações de pH , decorrentes da mistura das soluções de cloreto de cálcio e de ácido tartárico (com ou sem aditivo), ambas ajustadas a $\text{pH} = 3,5$. Estas oscilações são tidas em conta através do cálculo do $\text{pH}_{\text{médio}}$. É de referir contudo, que o pH demora alguns minutos até se estabilizar perto do valor pretendido (3,5), isto é, até se atingir o equilíbrio entre as espécies presentes em solução, o que influencia os valores de $\text{pH}_{\text{médios}}$ obtidos.

Nos ensaios com os ácidos orgânicos presentes na tabela 16, o pH oscila entre valores próximos de 3,5. Desta forma, o pH não deve ter influência no tempo de indução, pelo que os vários ensaios podem ser comparados entre si, avaliando apenas o efeito que o aditivo adicionado tem no tempo de indução.

O ácido láctico demonstrou ser dos três ácidos orgânicos referidos anteriormente o que menos influência tem no tempo de indução associado à precipitação do CaT. Por comparação dos tempos de indução obtidos, para concentrações molares semelhantes de cerca de 0,02 M, observa-se pela tabela 16, que o ácido málico demonstra ser o que tem um efeito mais determinante na inibição do CaT, seguido pelo ácido cítrico e por fim, o ácido láctico. As velocidades de precipitação (m_1) obtidas, a esta concentração molar e para estes ácidos, apresentam-se no anexo 6, com os devidos comentários.

O ensaio com adição de 2,3 g/L de ácido láctico foi repetido duas vezes, tendo-se obtido o mesmo tempo de indução nas duas situações.

Pela representação gráfica apresentada na figura 20, observa-se que as oscilações de pH registadas até a precipitação ter tido início, não tiveram influência no tempo de indução. Nota-se contudo um desfasamento nos valores de potencial iniciais, para as duas situações. Este facto pode dever-se a, tal como já tinha sido atrás sugerido, a resposta inicial do eléctrodo ser afectada pelo pH inicial da solução. No entanto, neste caso a um maior pH corresponde um maior potencial.

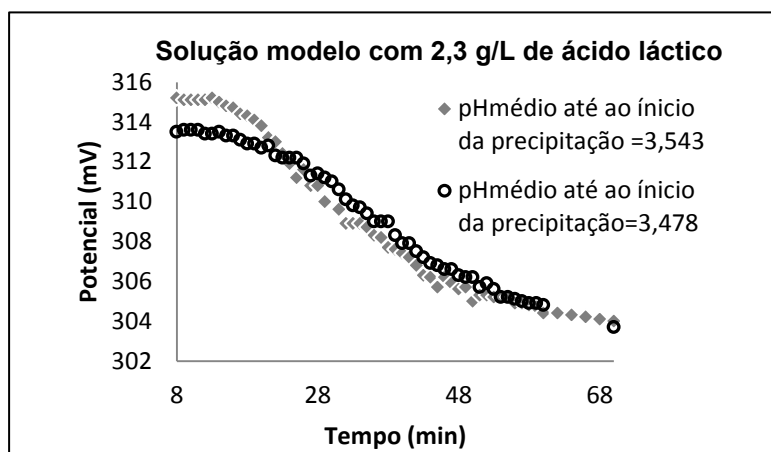


Figura 20. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com a solução modelo com 2,3 g/L de ácido láctico.

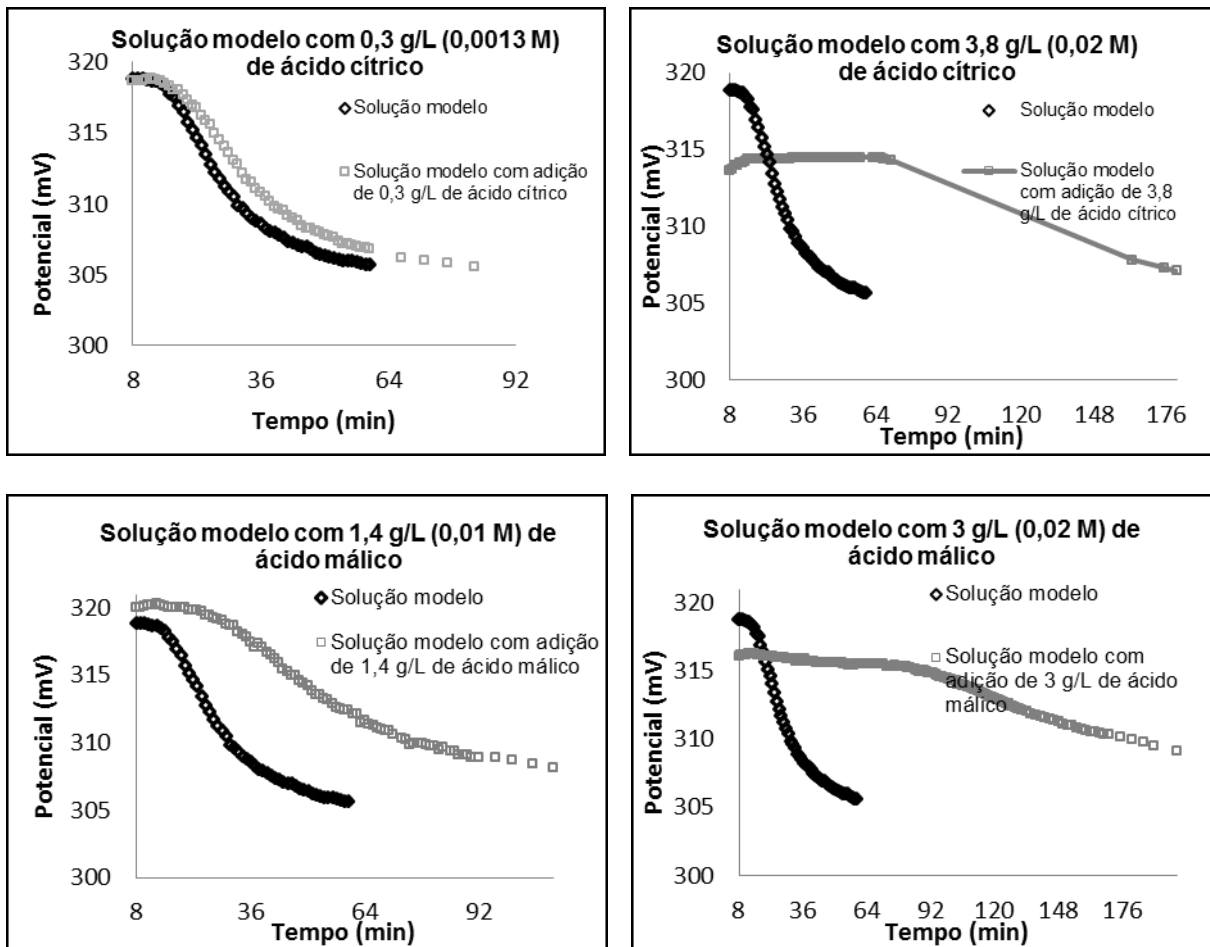
Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L.
Condições operatórias: $T = 15^{\circ}C$; velocidade de agitação = 850 rpm; Força iónica 0,046 M.

O ácido málico e cítrico demonstraram ter um maior efeito no tempo de indução associado à precipitação do CaT. Para ambos os casos quanto maior é a concentração de cada um destes ácidos adicionados à solução modelo mais notório demonstrou ser o atraso no tempo de indução. Este atraso é observável pela extensão do patamar que antecede o decréscimo do potencial, isto é, que antecede o início da precipitação (Figura 21).

O ácido málico, quando adicionado a uma concentração molar igual à do ácido cítrico (0,02 M), revelou ter um efeito mais inibidor (Figura 21).

Figura 21. Representações gráficas do potencial em função do tempo para os ensaios com adição de ácido cítrico e ácido málico a diferentes concentrações.

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$.
Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm.



Nos ensaios, em que os ácidos orgânicos, cítrico e málico, foram adicionados a maiores concentrações (0,02 M) observa-se um maior desfasamento entre os valores de potencial para estas soluções relativamente à solução modelo sem aditivo.

O aumento da concentração do aditivo, traduz-se num aumento da força iónica da solução, o que implica uma maior diferença relativamente à solução usada para comparação (solução sem aditivo). Contudo, apesar da variação desta condição operatória poder condicionar os valores de potenciais obtidos, esta não se apresenta como a única razão capaz de explicar o desfasamento observado. Outra possível razão para a obtenção de um menor valor de potencial, nas soluções com maiores concentrações de aditivo, pode estar relacionada com a influência que o aditivo desempenha na inibição da nucleação, nomeadamente com a capacidade que este tem para se ligar ao cálcio, visto que se tal ocorrer a concentração de cálcio em solução diminui, o que implica uma diminuição no valor de potencial registado.

A ligação do cálcio com cada um destes ácidos (cítrico e málico), para o pH em estudo, foi confirmada por McKinnon *et al.* (1995) e ajuda a entender melhor o mecanismo associado à inibição

da precipitação do CaT, por parte destes ácidos orgânicos, e a suportar a ideia de que o desfasamento entre os potenciais possa estar, de facto, relacionado com isso.

O ácido málico, quando adicionado à mesma concentração molar do ácido cítrico, revelou ser um inibidor mais efectivo da nucleação. Contudo, quando testados à mesma concentração mássica, o ácido cítrico demonstrou, pelo tempo de indução, ter um efeito ligeiramente mais inibidor do que o ácido málico. Esta observação está de acordo com o obtido por McKinnon, *et al.* (1995), que concluiu que quando adicionados à mesma concentração mássica (2g/L) a ordem de inibição demonstrada por estes ácidos orgânicos é a seguinte: ácido cítrico>ácido málico. Estes autores obtiveram, contudo, uma diferença mais significativa para os tempos de indução entre o ácido cítrico e o málico.

O ácido glucónico é outro dos ácidos orgânicos existentes no vinho. Este ácido, que recebe também a designação de gluconato de sódio, tem um grande poder sequestrador e é um bom quelante a pH alcalino (Ramachandran *et al.*, 2006), isto é, um composto capaz de “aprisionar” iões metálicos, como por exemplo o cálcio, dando origem a quelatos.

Por estas razões, optou-se por estudar a influência deste ácido no tempo de indução do CaT, ao pH de estudo. Inicialmente, adicionou-se à solução modelo 2 g/L de ácido glucónico, concentração limite em que este pode estar presente no vinho (consultar tabela 2). Nestas condições, e tal como consta na tabela 16, não ocorreu precipitação durante o tempo de ensaio. Averiguou-se posteriormente, se uma diminuição na concentração deste ácido, para metade da concentração inicialmente considerada, revelava ter um efeito menos inibidor. Tal não se verificou.

Assim, de entre todos os ácidos orgânicos, testados acima, este foi o que revelou ter um maior efeito no tempo de indução associado à precipitação do CaT. A inibição da precipitação espontânea do CaT, demonstrada por este aditivo pode dever-se: 1) à ligação entre o ião de cálcio e o ácido glucónico, ao pH em estudo, para formar o gluconato de cálcio ou 2) ser consequência, desta espécie dificultar a agregação da espécie solúvel de CaT (aq), o que consequentemente retarda a nucleação e a ocorrência da precipitação.

A representação gráfica do potencial em função do tempo ajuda a suportar a primeira hipótese (figura 22). Nesta figura, observa-se que o potencial registado ao fim de 8 minutos, para a solução modelo com 1 g/L de ácido glucónico, sofre uma diminuição considerável face à situação da solução modelo sem aditivo.

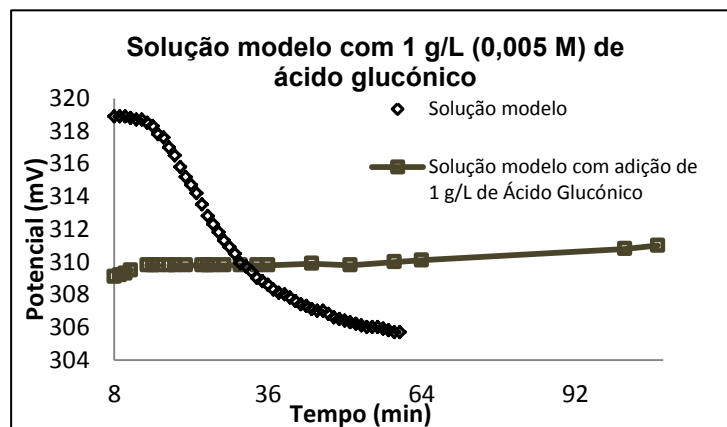


Figura 22. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com adição de 1g/L de ácido glucónico.

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$.
Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm.

Uma possível explicação para o sucedido, e tal como já foi referido anteriormente, pode dever-se ao estabelecimento de uma ligação entre o íão cálcio e o ácido glucónico. Se tal se verificar, o Ca^{2+} presente em solução diminui, o que conseqüentemente se traduz numa diminuição do potencial lido pelo eléctrodo. Com o decorrer do ensaio, observa-se uma certa estabilização do potencial, o que indica que a concentração de Ca^{2+} em solução não sofre grandes alterações.

Por observação da tabela 16, nota-se que a ordem de inibição demonstrada pelos principais ácidos orgânicos existentes no vinho (ácidos: láctico, málico e cítrico) parece estar relacionada com a presença e o número de grupos carboxílicos. O ácido láctico, com apenas um grupo carboxílico, demonstrou ser o ácido com menos capacidade de inibir a precipitação do CaT. Os ácidos málico e cítrico, com dois e três grupos carboxílicos, respectivamente, revelaram ter um efeito mais inibitório na precipitação. Contudo, nestas duas situações, não dá para concluir se a presença ou não de mais um grupo carboxílico tem influência na precipitação, dado que, para concentrações mássicas iguais o ácido cítrico revela ser ligeiramente mais inibidor do que o málico. Contudo, considerando concentrações molares iguais ocorre o oposto.

A inibição da precipitação do CaT por parte do ácido glucónico, parece indicar a existência de uma relação entre a combinação dos grupos carboxílicos e hidroxilos na inibição da precipitação do CaT.

- **Outros ácidos orgânicos testados**

Outros ácidos orgânicos foram testados com o objectivo de tentar entender se há alguma característica estrutural que torne um aditivo mais eficiente na inibição do CaT.

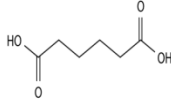
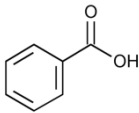
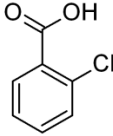
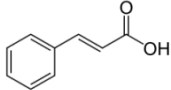
Tendo isto em mente, testaram-se os ácidos orgânicos com um ou mais grupos carboxílicos. Com a maioria dos compostos testados, pretendeu avaliar-se também se a existência de um anel aromático ligado a um grupo carboxílico revelava ter algum efeito na inibição.

Partiu-se do pressuposto que a presença de um anel benzénico em solução poderia, de alguma forma, dificultar a interacção entre o íão cálcio e o íão tartarato, dificultando a formação da espécie CaT(aq) solúvel ou dificultando a sua agregação, com a conseqüente formação da espécie de CaT insolúvel, que conduz à ocorrência de precipitação. Na maioria destes ensaios, a adição dos ácidos foi feita a concentrações molares que permitissem o estabelecimento de comparações.

Os resultados obtidos, nesses ensaios, apresentam-se na tabela 17.

O ácido adípico foi adicionado à solução modelo, a uma das concentrações molares que tinha sido considerada nos ensaios com o ácido cítrico, tendo-se verificado que este ácido, ao contrário do ácido cítrico, não demonstrou ter influência no tempo de indução do CaT.

Tabela 17. Efeito de outros ácidos orgânicos no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT .
 Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$.
 Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; $\text{pH}_{\text{médio}}$ e força iónica (FI) indicados abaixo.

Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	$\text{pH}_{\text{médio}}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo	0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com ácido adípico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 146,14 \text{ g/mol}$)	 0,979 g/L (0,0067 M)	3,617 (0,8%)	13	0,038
		3,444 (4%)	13	0,038
Solução modelo com ácido benzóico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 122,12 \text{ g/mol}$)	 0,03 g/L (0,00022 M)	3,511 (2,1%)	12	0,038
		2,4 g/L (0,02 M)	3,512 (2,1%)	4**
Solução modelo com ácido 2-clorobenzóico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 156,57 \text{ g/mol}$)	 0,78 g/L (0,005 M)	3,479 (3%)	9	0,042
Solução modelo com ácido trans-cinâmico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 148,16 \text{ g/mol}$)	 0,03 g/L (0,00022 M)	3,534 (1,5%)	11	0,038

** Este tempo de indução pode não ser referente à precipitação do CaT. Neste ensaio pode ter precipitado o dibenzoato de cálcio.

Contudo, no que diz respeito aos parâmetros usados para avaliar a velocidade de precipitação (m_1 e K'_G) (ver anexo 6), verifica-se uma diminuição de ambos face à solução sem aditivo, sendo a redução de m_1 e K'_G de, respectivamente, 32,6% e 29,7%. Ambos os parâmetros parecem indicar que este ácido, apesar de não afectar a nucleação, é responsável por uma certa diminuição na velocidade de crescimento dos cristais de CaT.

O facto do ácido cítrico ter mais um grupo carboxílico pode constituir o factor estrutural responsável, por este ácido apresentar uma maior influência na inibição da nucleação do CaT, como foi anteriormente sugerido.

Contudo, ao comparar-se o ácido glucónico (1 grupo carboxílico) com o ácido adípico (2 grupos carboxílicos) não se verifica este factor estrutural e no entanto o ácido glucónico, para concentrações molares próximas à considerada para o ácido adípico, revelou ter um maior efeito na nucleação do CaT (tabela 16).

Esta observação está de acordo com o obtido por McKinnon *et al.* (1995). Estes autores testaram às mesmas concentrações (2 g/L) os ácidos orgânicos: ácido láctico (1 grupo carboxílico) e o ácido succínico (2 grupos carboxílicos), ambos existentes no vinho, e observaram que o ácido succínico revelou apresentar uma menor influência no tempo de indução do que o ácido láctico, o que se provou estar relacionado com o facto de não se estabelecer uma ligação (a pH=3,5) entre o ião cálcio e o ácido succínico, ao contrário do que se verifica com o ácido láctico.

Relativamente aos outros três ácidos orgânicos testados (ácido benzóico (à concentração de 0,03 g/L); ácido 2-clorobenzóico e ácido trans-cinâmico) verifica-se que nenhum deles revelou ter qualquer tipo de influência no atraso da inibição do CaT.

A presença dos ácidos, benzóico (0,03 g/L) e trans-cinâmico demonstrou não afectar o decaimento do potencial com o tempo (m_1). Relativamente à constante K'_G esta sofre uma diminuição em ambos os casos: 36,3% para o ácido trans-cinâmico e 18,2% para o ácido benzóico (0,03 g/L). O facto, destes dois parâmetros não evoluírem da mesma forma não permite retirar nenhuma conclusão relativamente à velocidade de crescimento dos cristais nestes ensaios.

O ácido benzóico quando adicionado a maiores concentrações (2,4 g/L), revelou um comportamento muito distinto dos restantes ensaios, no que respeita ao tempo de indução, na medida em que parece induzir a precipitação. O facto deste ácido ter sido adicionado a uma concentração molar superior à do ácido tartárico, pode ter conduzido à formação preferencial do dibenzoato de cálcio (sal de cálcio do ácido benzóico) e dado que, esta espécie é pouco solúvel em água, pode ter precipitado. Desta forma, a diminuição do potencial pode ter sido uma resposta à precipitação deste composto e não do CaT. Por uma questão de tempo, não se conseguiu analisar o precipitado, por exemplo, por infra-vermelhos, de modo a confirmar a hipótese apresentada.

7.6.3.2.2. Ácidos fenólicos

O estudo da influência dos ácidos fenólicos na precipitação do CaT foi feito, na maioria dos casos, para as concentrações médias em que estes se encontram presentes no vinho (0,03 g/L).

Ao contrário dos ácidos orgânicos, presentes no vinho, os ácidos fenólicos não parecem exercer nenhum efeito inibitório a nível da precipitação do CaT. Pelo contrário, a presença destes ácidos, em alguns casos, parece ter tendência a aumentar ligeiramente a instabilidade (tabela 18).

Nos casos em que os tempos apresentam um considerável adiantamento, relativamente ao tempo de indução da solução modelo sem aditivo, ou quando se adicionam maiores concentrações mássicas destes ácidos, não se pode concluir que o precipitado seja de facto o CaT, sem, como se referiu anteriormente para o ácido benzóico, se proceder a uma análise de IV, para confirmar a estrutura química do precipitado.

Tabela 18. Efeito dos ácidos fenólicos existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$. Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; $\text{pH}_{\text{médio}}$ e força iónica (FI) indicados abaixo.

Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	$\text{pH}_{\text{médio}}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo	0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com ácido hidroxibenzóico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 138,12 \text{ g/mol}$)	0,03 g/L (0,00022 M)	3,519* (1,9%)	9	0,038
	0,15 g/L (0,01 M)	3,55 (1%)	12	0,039
Solução modelo com ácido vanílico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 168,14 \text{ g/mol}$)	0,03 g/L (0,00022 M)	3,49 (2,7%)	13	0,038
	0,8405 g/L (0,005 M)	3,48 ** (2,9%)	11	0,038
Solução modelo com ácido p-coumárico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 164,16 \text{ g/mol}$)	0,03 g/L (0,0002 M)	3,54* (1,3%)	11	0,038
Solução modelo com ácido salicílico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 138,12 \text{ g/mol}$)	0,03 g/L (0,0002 M)	3,51 (2,1%)	9	0,038
	0,69 g/L (0,005 M)	3,52 (1,9%)	4**	0,042
Solução modelo com ácido gálico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 170,02 \text{ g/mol}$)	0,85 g/L (0,005 M)	3,54* ** (1,3%)	11	0,039
	1,70 g/L (0,01 M)	3,52* ** (1,9%)	11	0,039

*Foi feita a aferição do pH por adição de NaOH

**Não se pode concluir que este tempo esteja relacionado com o TI do CaT.

Tal não foi feito neste trabalho por motivos de tempo, mas é algo que futuramente será de interesse averiguar por forma a retirar mais conclusões. O ensaio que evidencia mais a situação anteriormente descrita é o ensaio com adição de 0,69 g/L ácido salicílico, sendo possível que durante este ensaio tenha ocorrido a formação da espécie salicilato de cálcio.

O facto dos compostos fenólicos se terem revelado pouco solúveis na solução de trabalho pode ter conduzido, a que estes quando adicionados a maiores concentrações, possam não se ter dissolvido totalmente. Deste modo, as partículas em suspensão podem ter induzido a precipitação.

O ácido hidroxibenzóico e o ácido salicílico apresentam a mesma composição química, mas uma estrutura diferente. Pelos resultados que constam na tabela 18, observa-se que quando adicionados

à mesma concentração molar, estes revelaram, ambos, não ter influência no tempo de indução, sendo que se obteve o mesmo tempo de indução para as duas situações. No entanto, a adição destes conduziu à obtenção de menores valores de K'_G , o que pode sugerir que estes provocam uma diminuição na velocidade de crescimento dos cristais.

O tempo de indução obtido (9 min) pode dever-se ao facto de não ocorrer ligação entre os referidos ácidos e o cálcio ao pH considerado, pelo que a presença destas espécies (ácido hidroxibenzoico e salicílico) em solução, podem ser responsáveis por interações electrostáticas, que de alguma forma, promovam a interacção dos iões cálcio e tartarato. Se tal acontecer, a precipitação do CaT pode ser “ligeiramente” favorecida.

A adição de 0,03 g/L ácido vanílico à solução modelo, revelou não ter influência no tempo de indução do CaT e demonstrou também não ter um grande impacto nos parâmetros m_1 (variação de 15%) e K'_G (variação de 13%).

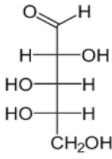
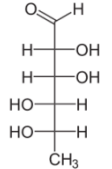
7.6.3.2.3. Açúcares

- **Açúcares neutros**

Os açúcares neutros representam outra das classes de grande importância nos vinhos, sendo os compostos mais abundantes num vinho, a seguir aos álcoois.

Os açúcares neutros testados foram a arabinose e a ramnose. A escolha destes açúcares deveu-se ao facto de, além destes estarem presentes no vinho também fazerem parte da constituição de polissacáridos como as AGP e as RG's. Na tabela 19 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios com adição dos açúcares neutros acima referidos.

Tabela 19. Efeito dos açúcares neutros existentes no vinho no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^\circ C$; velocidade de agitação = 850 rpm; $pH_{médio}$ e força iónica (FI) indicados abaixo.

	Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	$pH_{médio}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo		0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com arabinose ($MM_{aditivo} = 150,01$ g/mol)		0,08 g/L (0,0005 M)	3,467 (3,3%)	13	0,039
		0,4 g/L (0,003 M)	3,532 (1,5%)	13	0,039
Solução modelo com ramnose ($MM_{aditivo} = 164,16$ g/mol)		0,36 g/L (0,002 M)	3,490 (2,7%)	13	0,038
		1,4 g/L (0,008 M)	3,513 (2,1%)	13	0,038

Por observação da tabela 19 é possível observar que estes compostos demonstraram não exercer nenhuma influência na fase de nucleação do CaT, dado que se obteve o mesmo tempo de indução, comparativamente com a solução modelo.

As concentrações inicialmente usadas destes açúcares tiveram como base os teores em que estes se encontram presentes no vinho. Ribéreau-Gayon, *et al.* (2006) refere que o vinho contém sempre pequenas quantidades de pentoses, entre 0,3 e 2 g/L em raros casos. As principais pentoses identificadas nas uvas e nos vinhos são a L-arabinose e a D-xilose, sendo que estas representam algumas centenas de mg/L. Este autor refere também que a L-ramnose está presente em concentrações menores do que 100 mg/L.

As concentrações testadas de L-arabinose foram 80 e 400 mg/L. Dado que este açúcar neutro revelou não ter efeito no tempo de indução do CaT, optou-se por testar concentrações de ramnose superiores às presentes no vinho (360 mg/L e 1400 mg/L).

O facto de ambos os açúcares apresentarem constantes de dissociação muito baixas (ver anexo 5), compromete a capacidade destes se ligarem ao ião cálcio, e pode ser a razão pela qual estes açúcares demonstraram não ter efeito no tempo de indução. Ambos os açúcares demonstraram, também, não ter um grande efeito nos parâmetros m_1 e K'_G (ver anexo 6), usados para comparar os diferentes ensaios face à velocidade de precipitação. A figura 23 representa a evolução do potencial com o tempo para os ensaios com adição de arabinose à solução modelo. Observa-se um comportamento muito idêntico das curvas de potencial, para ambas as situações.

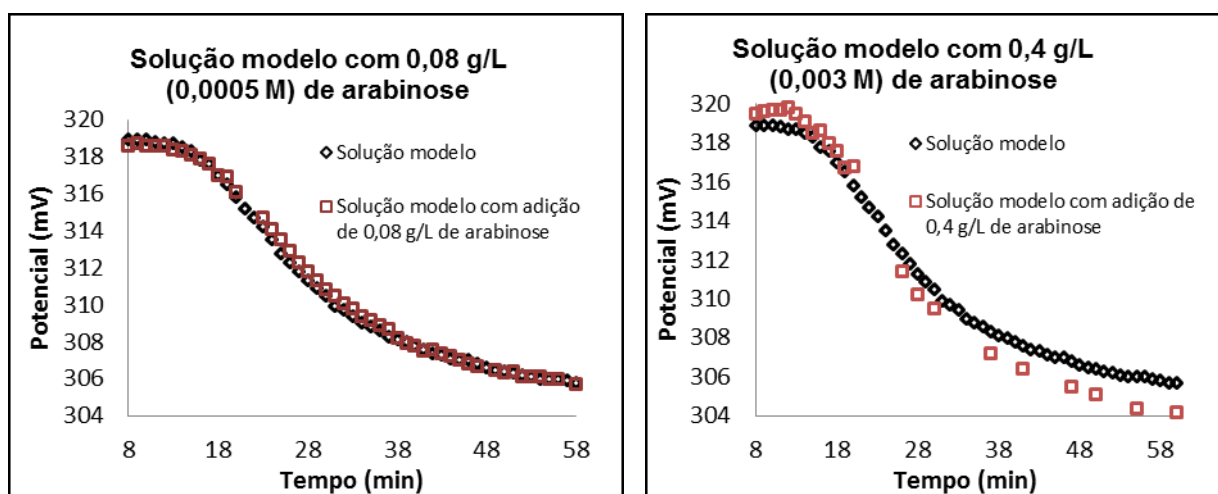


Figura 23. Representações gráficas do potencial em função do tempo para os ensaios com adição de 0,08 g/L de arabinose (à esquerda) e 0,4 g/L de arabinose (à direita) Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^\circ C$; velocidade de agitação = 850 rpm.

A adição de 1,4 g/L de ramnose à solução modelo foi a situação que conduziu a uma maior variação nos parâmetros m_1 e K'_G , relativamente à solução modelo. Segundo estes parâmetros a ramnose, a esta concentração, é responsável por um aumento da velocidade de decaimento do potencial (m_1) em 26% e da constante K'_G em 37%. Estes valores são apenas indicativos de um ensaio. Para retirar uma conclusão mais precisa, deve aumentar-se a reprodutibilidade do ensaio e observar se a mesma relação se mantém.

Os resultados obtidos estão de acordo com o que foi obtido por McKinnon *et al.* (1995). Estes autores concluíram que a adição de 5 g/L de glucose e 5 g/L de frutose (ambos açúcares neutros) a uma solução modelo hidroalcoólica, demonstrou não ter efeito na nucleação nem no crescimento dos cristais de CaT.

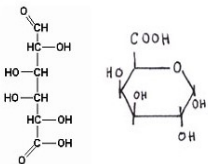
- **Açúcares ácidos**

Dentro desta subclasse optou-se por testar o ácido galacturónico. Este ácido constitui o ácido urónico mais abundante no vinho, constituindo também a estrutura principal de polissacáridos, como por exemplo, as RG's.

Pretende averiguar-se, nesta fase, se este açúcar ácido tem influência na nucleação do CaT. Numa primeira abordagem adicionou-se, este composto, à solução modelo a uma concentração que se encontra dentro dos limites existentes no vinho. Sponholz e Dittrich (1984) indicam que este ácido se encontra presente, nos vinhos brancos de mesa alemães, em teores compreendidos entre 0,15 e 1 g/L. Esta gama de valores está de acordo com o indicado por Curvelo-Garcia (1988): 0,04 e 1 g/L.

As concentrações testadas de 0,35 e 1 g/L, pretendem avaliar se este composto desempenha alguma influência na nucleação do CaT. às concentrações nas quais pode estar presente no vinho. Numa fase posterior, avalia-se o efeito da concentração no tempo de indução do CaT, sendo que para tal se considera uma concentração de 3,88 g/L. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 20.

Tabela 20. Efeito do ácido galacturónico no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: [Ca²⁺]=140 mg/L e [Ácido tartárico]=2,2 g/L. Condições operatórias: T=15°C; velocidade de agitação=850 rpm; pH_{médio} e força iónica (FI) indicados abaixo.

Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	pH _{médio} até ao início da precipitação		
		(% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo	0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com ácido galacturónico (MM _{aditivo} =194,14 g/mol) 	0,35 g/L (0,0016 M)	3,488 (2,76%)	19	0,039
	1 g/L (0,0047 M)	3,565 (0,61%)	24	0,041
	3,88 g/L (0,02 M)	3,567 (0,58%)	97	0,049

O efeito do ácido galacturónico no tempo de indução demonstrou estar relacionado com a concentração deste em solução, sendo que para maiores concentrações maiores foram os tempos de indução obtidos, como se observa pela tabela 20.

Quando adicionado a uma concentração de 0,35 g/L, este aditivo demonstrou atrasar o tempo de indução e o decaimento do potencial com o tempo (m_1) (figura 24).

McKinnon *et al.* (1996) verificou que a adição de 0,5 g/L deste ácido a uma solução modelo (pH=3,5) não teve um efeito significativo no tempo de indução, mas conduziu a uma diminuição da velocidade de cristalização. Tal parece estar de acordo com o que foi obtido no presente trabalho.

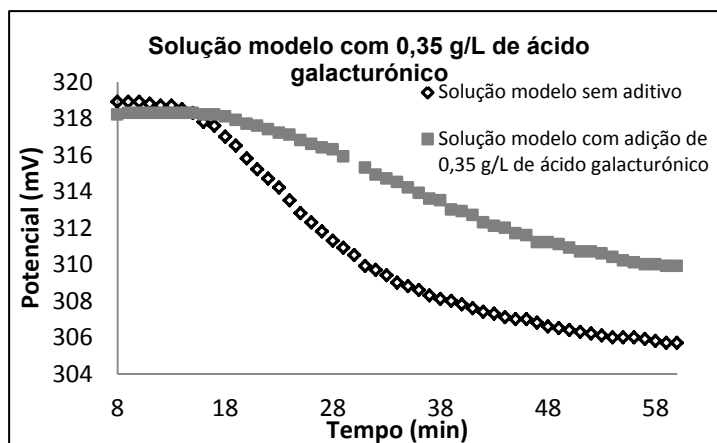


Figura 24. Representação gráfica do potencial em função do tempo para o ensaio com adição de 0,5 g/L de ácido galacturônico.

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L.
Condições operatórias: $T = 15^\circ C$; velocidade de agitação = 850 rpm.

Observa-se pela figura 24, que praticamente não existe nenhum desfasamento entre os potenciais iniciais para a situação sem e com aditivo. A existência de um maior desfasamento é mais notória quando se aumenta a concentração de ácido galacturônico adicionada (figura 25). O desfasamento é indicativo da diminuição da quantidade de cálcio presente em solução. Esta diminuição pode dever-se ao estabelecimento de uma ligação entre o cálcio e o ácido galacturônico, como se referiu em situações anteriores, e ajuda a explicar a obtenção de maiores tempos de indução, à medida que se aumenta a concentração adicionada deste composto.

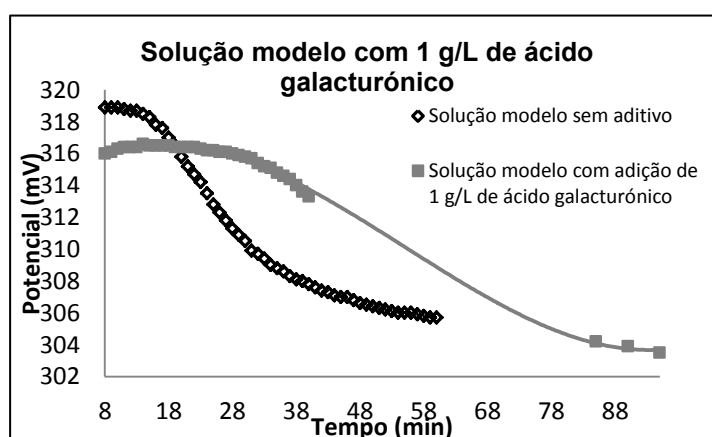


Figura 25. Representação gráfica do potencial em função do tempo para o ensaio com adição de 1 g/L de ácido galacturônico.

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L.
Condições operatórias: $T = 15^\circ C$; velocidade de agitação = 850 rpm.

Na figura 25 e devido à falta de valores de potenciais intermédios na fase de decaimento do potencial com o tempo, procurou-se ajustar os pontos existentes, de modo a obter um comportamento do potencial com o tempo para esta situação. O ajuste potencial de 3ª ordem demonstrou ser um bom ajuste aos pontos experimentais.

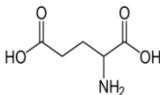
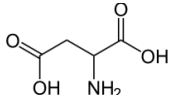
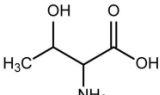
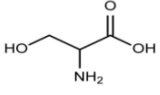

7.6.3.2.4. Aminoácidos

Nesta fase testou-se a influência que determinados aminoácidos, a maioria deles presentes no vinho, têm no tempo de indução do CaT. Todos os aminoácidos testados contêm grupos carboxílicos ou hidroxilos na cadeia lateral podendo, de acordo com o que foi observado para os ácidos orgânicos, ter as características estruturais adequadas para agirem como potenciais agentes ligantes do cálcio.

Os resultados obtidos nos ensaios com os aminoácidos encontram-se apresentados na tabela 21.

Tabela 21. Efeito dos aminoácidos presentes no vinho, excepto a glicina, no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT.

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$.
Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm; $\text{pH}_{\text{médio}}$ e força iónica (FI) indicados abaixo.

	Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	$\text{pH}_{\text{médio}}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo		0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com ácido glutâmico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 147,13 \text{ g/mol}$)		0,39 g/L (0,0027 M)	3,553 (0,95 %)	12	0,038
		1,47 g/L (0,01 M)	3,532 (1,5 %)	13	0,039
Solução modelo com ácido aspártico ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 133,11 \text{ g/mol}$)		0,535 g/L (0,004 M)	3,532 (1,5%)	15	0,043
		2,66 g/L (0,02 M)	3,582 * (0,14%)	10	0,066
Solução modelo com treonina ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 119,12 \text{ g/mol}$)		1,91 g/L (0,02 M)	3,541 (1,28%)	13	0,053
Solução modelo com serina ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 105,09 \text{ g/mol}$)		1,78 g/L (0,02 M)	3,478 (3%)	17	0,054
Solução modelo com glicina ($\text{MM}_{\text{aditivo}} = 75,06 \text{ g/mol}$) **		0,751 g/L (0,01 M)	3,544 (1,20%)	13	0,047

*A dissolução do ácido aspártico não foi completa (ao fim de 2 horas de agitação)

**A glicina é o único aminoácido, de entre os apresentados, que não se encontra presente no vinho.

O ácido glutâmico foi, numa primeira fase, adicionado à solução modelo à concentração limite em que se encontra presente no vinho (0,39 g/L), tendo demonstrado não ter nenhum efeito no tempo de indução. O aumento da concentração deste ácido para 1,47 g/L, revelou também não ter nenhum efeito no tempo de indução.

Os parâmetros m_1 e K'_G obtidos para os ensaios com o ácido glutâmico não permitem retirar nenhuma conclusão quanto à velocidade da precipitação, dado que a variação de m_1 indica que quanto maior é a concentração adicionada mais rápido é o decaimento do potencial com o tempo, o que indica que a precipitação possa estar a ser induzida por este aditivo. No entanto, o valor de K'_G nos dois casos não sofre praticamente nenhuma variação (2,19%).

Segundo McKinnon *et al.* (1995), a adição de ácido glutâmico a concentrações de 0,2 e 1 g/L demonstrou não ter efeito nem no tempo de indução, nem na velocidade de cristalização. Face a estes resultados, constata-se que o tempo de indução obtido no presente trabalho está de acordo com as conclusões retiradas por estes autores.

Os restantes aminoácidos (ácido aspártico; treonina e serina), foram testados a concentrações mássicas cinco vezes superiores às existentes no vinho (consultar tabela 1: secção 2.1.). A glicina, apesar de não fazer parte da constituição do vinho, foi testada à concentração de 0,01 M, para efeitos comparativos com o ensaio com ácido glutâmico, tendo-se verificado que este aminoácido, à semelhança do ácido glutâmico, não demonstrou ter qualquer tipo de influência no tempo de indução do CaT.

Todos os ensaios realizados com os diferentes aminoácidos revelaram não ter nenhuma influência no tempo de indução, com excepção do ensaio realizado com a serina. De facto este aminoácido, à concentração em que foi adicionado, demonstrou ter um efeito no tempo de indução ligeiramente superior, ainda que não muito significativo, ao verificado para os outros ensaios.

Assim se, às concentrações testadas, os aminoácidos revelaram não ter influência no atraso da precipitação do CaT, então às concentrações em que estão presentes no vinho também não deverão ter influência.

O ácido aspártico, quando adicionado a uma concentração de 2,66 g/L, demonstrou ter um efeito oposto relativamente aos outros ensaios, visto que o tempo de indução, obtido para esta situação, foi um pouco menor do que o obtido para a solução modelo sem aditivo. O facto da dissolução deste ácido na solução de trabalho não ter sido completa, pode ter favorecido a ocorrência de nucleação secundária e, deste modo, ter favorecido a ocorrência de precipitação.

Comparativamente com as outras classes de aditivos abordadas anteriormente, a adição de aminoácidos foi a que revelou conduzir a maiores variações nos valores de força iónica obtidos, relativamente à solução modelo.

Uma vez que os potenciais obtidos pelo eléctrodo são afectados pela força iónica e é por recurso a estes valores que se obtém quer o declive do potencial com o tempo (m_1), quer a constante K'_G , optou-se por não comparar estes parâmetros nas situações em que a força iónica varia face à situação da solução modelo sem aditivo, de forma a não incorrer em interpretações incorrectas relativas à velocidade de precipitação. Dado que, segundo a literatura e tal como foi abordado na

secção 4, um aumento da força iónica está relacionado com uma diminuição da velocidade de crescimento dos cristais.

McKinnon. *et al.* (1995), estudaram a influência da serina, da treonina e do ácido aspártico a concentrações de 0,2 g/L, tendo concluído que nenhum destes aminoácidos demonstrou ter um efeito significativo quer no tempo de indução, quer no crescimento dos cristais. A razão apresentada para este facto, deve-se à inabilidade dos aminoácidos se ligarem ao cálcio para os valores de pH característicos dos vinhos.

7.6.3.2.5. Outros compostos

- **Fosfato**

O fosfato encontra-se presente no vinho em concentrações compreendidas entre 0,05 a 0,9 g PO₄/L, a um valor médio de 0,29 g/L (Ough *et al.*, 1988). O efeito deste composto (sob a forma de (NH₄)₂HPO₄) foi avaliado através da adição de 0,5 g/L à solução modelo, tendo-se verificado que este não exerceu praticamente nenhuma influência no tempo de indução.

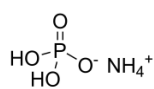
Para testar se um aumento na concentração se traduzia num efeito mais acentuado no tempo de indução aumentou-se a concentração adicionada à solução modelo para 2,3 g/L. Verificou-se, contudo, que o tempo de indução obtido nesta situação não sofre alterações face à situação anterior.

Assim, estes resultados indicam que a presença de fosfato não revela ter um efeito inibidor na nucleação do CaT, o que pode sugerir que a ligação entre o cálcio e o fosfato, não ocorre às condições experimentais testadas. McKinnon *et al.* (1995) testaram esta hipótese, tendo concluído que ao pH de 3,5 não ocorria nenhuma ligação entre o cálcio e o fosfato, isto porque aos valores de pH normais do vinho, o fosfato se encontra predominantemente na forma H₂PO₄⁻, o que faz com que a formação de um complexo entre esta espécie e o cálcio não ocorra.

Dado que esta espécie conduz a uma variação significativa dos valores de força iónica da solução, face à solução modelo sem aditivo, e que a força iónica tem influência nos valores de potencial lidos pelo eléctrodo, optou-se por (à semelhança do que se considerou para os aminoácidos) não comparar estas duas situações relativamente ao decaimento do potencial em função do tempo e à constante K'_G.

Tabela 22. Efeito do fosfato no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: [Ca²⁺]=140 mg/L e [Ácido tartárico]=2,2 g/L. Condições operatórias: T=15°C; velocidade de agitação=850 rpm; pH_{médio} e força iónica (FI) indicados abaixo.

Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo g/L (M)	pH _{médio} até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)	FI (M)
Solução modelo	0 g/L	3,587	13	0,038
Solução modelo com dihidrogenofosfato de amónio	0,5 g/L (0,004 M)	3,518 (1,9%)	15	0,042
	2,3 g/L (0,02 M)	3,576 (0,3%)	16	0,057



- **Ágar**

O ágar é um polissacárido não ramificado, que resulta da mistura heterogénea de dois polissacáridos, a agarose e a agarpectina. O ágar é um composto utilizado como aditivo na indústria alimentar, estando incluído na classe dos aditivos espessantes e gelificantes. Apesar de não se encontrar presente no vinho, foi testado com o intuito de verificar se um aumento da viscosidade revelava ter influência na precipitação do CaT.

O ágar foi adicionado à solução modelo a uma concentração de 0,5 g/L. O procedimento envolvido na preparação desta solução diferiu, uma vez que este composto é insolúvel em água fria. Assim, numa primeira fase, dissolveu-se o ágar, por aquecimento. Esta solução foi, posteriormente, arrefecida de modo a formar um gel. Só nesta fase é que se adicionou o etanol e o ácido tartárico à solução. O decaimento do potencial verificou-se ao fim de 20 minutos.

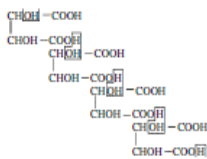
Dado que o ágar se trata de uma mistura complexa, pode não ter ocorrido a precipitação do CaT, mas sim de outra espécie, pelo que deve ser efectuada uma análise ao precipitado obtido para confirmar a sua composição.

Se o precipitado se tratar de CaT, então pode concluir-se que a adição deste composto tem uma influência na nucleação. O aumento da viscosidade da solução pode de alguma forma diminuir a mobilidade dos iões em solução, o que se traduz num atraso da precipitação.

- **Ácido Metatartárico**

O ácido metatartárico é um aditivo já muito utilizado na estabilização tartárica de vinhos. O seu efeito foi avaliado através da adição deste à solução modelo. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 23.

Tabela 23. Efeito do ácido metatartárico no tempo de indução (TI) da precipitação do CaT. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^{\circ}C$; velocidade de agitação = 850 rpm.

	Estrutura do aditivo	Concentração do aditivo (mg/L)	TI (min)
Solução modelo		0	13
Solução modelo com ácido metatartárico (não é indicada uma massa molecular para este aditivo)		10	>230
		100	>274

Como seria de esperar não se verificou a ocorrência de precipitação de CaT, durante o tempo de duração dos ensaios, nem para concentrações tão baixas como 10 mg/L.

7.6.4. Ensaios de precipitação com os polissacáridos obtidos pelos ensaios de UF com o vinho tinto

Nesta última fase do trabalho, pretendeu avaliar-se a influência dos polissacáridos isolados do vinho tinto (consultar secção 7.5) na precipitação do CaT. Para tal, e à semelhança do que foi feito com os aditivos comerciais anteriormente abordados, adicionaram-se os precipitados obtidos à solução modelo e registou-se, para cada caso, o tempo associado ao início da precipitação (tempo de indução).

Nestes ensaios, e dado que não se conhece com exactidão a composição dos precipitados adicionados, efectuam-se as leituras dos potenciais com dois intuits principais:

1) O registo da variação do potencial com o tempo, de modo a verificar se a diminuição, destes valores, ocorre no instante em que se inicia a turvação da solução (à semelhança do que, aliás, foi feito nos ensaios anteriores). Assim, consegue ter-se a confirmação de que o que está a precipitar é um composto de cálcio, e que se trata possivelmente do CaT

2) A comparação entre os potenciais obtidos nestes ensaios e os registados para a solução modelo sem aditivo. Esta comparação pode funcionar como uma indicação relativamente à existência de Ca^{2+} nos precipitados de polissacáridos adicionados à solução modelo, sendo esta situação mais provável de se verificar com os precipitados obtidos a partir do permeado. Uma diferença, não muito grande, nos valores de potenciais para estas duas situações pode dever-se, possivelmente, à resposta do eléctrodo face uma variação de força iónica, o que se for o caso suporta a hipótese de que o precipitado pode conter, além de polissacáridos, minerais.

A possibilidade de poderem estar presentes compostos minerais nos precipitados polissacáridos, reforça a importância da medição dos potenciais com recurso ao eléctrodo selectivo de cálcio. Sendo, o potássio o mineral mais abundante no vinho, como se referiu na secção 2.1, se este estiver presente nos precipitados adicionados à solução modelo poderia incorrer-se no erro de considerar que o precipitado era CaT, quando na verdade poderia ser KHT. O recurso ao eléctrodo selectivo aos iões de cálcio evita que tal ocorra, uma vez que, a precipitação do KHT não conduziria a uma variação no valor do potencial.

As concentrações usadas nestes ensaios foram estabelecidas de acordo com a quantidade de precipitado obtida na etapa de precipitação com etanol (consultar secção 7.5) e de modo a que a concentração mássica adicionada fosse igual, para efeitos comparativos. Tal conseguiu garantir-se com as fracções de concentrados mas não com a de permeado. Isto porque o permeado é mais empobrecido em polissacáridos.

Dado que, nestes ensaios são adicionadas pequenas concentrações de precipitados polissacáridos, é de esperar que o precipitado formado seja o CaT. No entanto, esta hipótese, deve ser confirmada futuramente por análise do precipitado.

Na tabela 24 apresenta-se a influência que os polissacáridos obtidos a partir dos ensaios de UF com a membrana FS40PP (100 kDa) demonstraram ter nos tempos de indução.

Tabela 24. Efeito dos polissacáridos obtidos a partir dos ensaios de UF com a membrana FS40PP (100 kDa) no tempo de indução (TI).

Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e [Ácido tartárico]=2,2 g/L.
Condições operatórias: T=15°C; velocidade de agitação=850 rpm; pH_{médio} indicado abaixo.

	Factor de concentração volumétrico (FCV)	Concentração do aditivo mg/L	pH médio até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)
Solução modelo		0	3,587	13
	1,5	300	3,505 (2,29%)	15
	2	300	3,504 (2,3%)	17
Solução modelo com concentrado	3	300	3,556 (0,86%)	16
	4	300	3,451 (3,79%)	33
	4,5	300	3,507 (2,23%)	36
Solução modelo com permeado	4,5	200	3,509 (2,17%)	17

A interpretação dos resultados envolve o conhecimento da composição polisacáridica de cada uma das fracções. Pode ter-se uma ideia dos polissacáridos presentes no concentrado e permeado, através das massas moleculares reportadas na literatura. Pela tabela 2, que consta no enquadramento teórico, observa-se que tanto as MP como as AGP's têm pesos moleculares maiores do que 100 kDa, pelo que é expectável que estes polissacáridos façam parte da constituição dos precipitados dos concentrados (obtidos para vários FCV).

Para as MP é apresentada uma grande gama de massas moleculares, algumas delas inferiores a 100 kDa, pelo que este polissacárido pode estar presente quer no concentrado, quer no permeado obtido por esta membrana.

Pela tabela 18, observa-se que a adição dos polissacáridos correspondentes aos concentrados com maior FCV, revela ter uma influência, embora em alguns casos esta não seja significativa, nos tempos de indução obtidos.

Por observação das figuras abaixo representadas (Figuras 26 e 27), constata-se que, para algumas situações, parece existir uma tendência entre a evolução do potencial com o tempo e o FCV. Por exemplo, os precipitados obtidos aos FCV de 4 e 4.5, e para os quais se obtiveram iguais teores de polissacáridos, apresentam uma evolução de potencial com o tempo (m_1) bastante similar

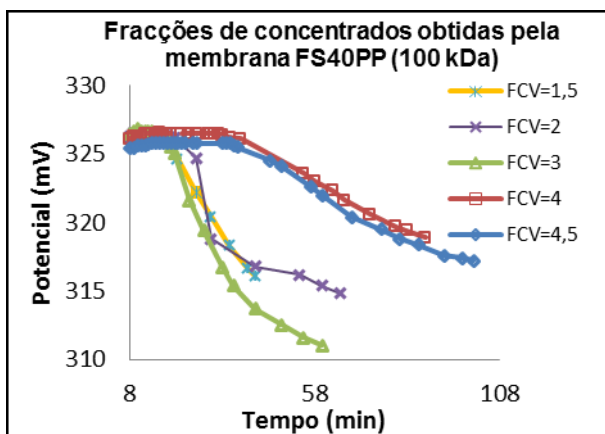


Figura 27. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com adição das fracções de concentrados obtidas pela membrana FS40PP (100 kDa) à solução modelo. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^{\circ}C$; velocidade de agitação = 850 rpm.

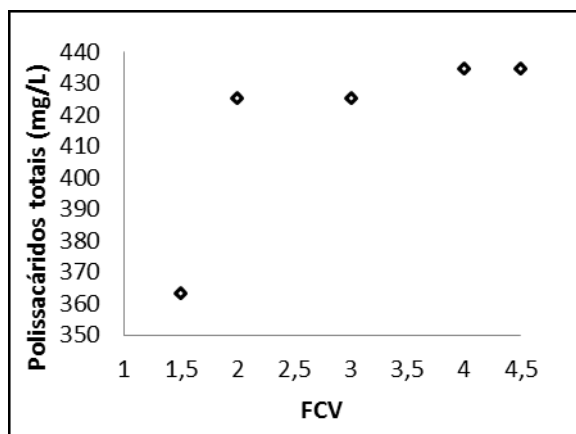


Figura 27. Representação gráfica do teor de polissacáridos totais em função do FCV.

A evolução do potencial com o tempo, no ensaio com o precipitado com FCV de 3 revela um comportamento distinto dos outros no que respeita à evolução do potencial com o tempo, que parece indicar que neste caso o factor preponderante na velocidade de precipitação (avaliada pelo decaimento do potencial com o tempo) pode não estar apenas relacionada com a concentração de polissacáridos totais, mas também com o tipo de polissacáridos e a concentração em que estes estão presentes no precipitado.

Podem referir-se também que os teores de polissacáridos obtidos pelo método fenol-sulfúrico, podem estar dependentes do factor de diluição utilizado, sendo que neste caso a utilização de uma maior diluição dos precipitados de polissacáridos poderia ter conduzido à obtenção de amostras com gradações de cor mais distintas. Possivelmente a diluição referida no procedimento adoptado não era a ideal, para as amostras de precipitados obtidas, o que pode ter conduzido à obtenção de amostras muito concentradas em polissacáridos, tendo-se desta forma obtido amostras com semelhantes gradações de cor (ver figura 18), o conseqüentemente conduziu a que pelo método espectrofotométrico, se obtivessem, para algumas situações, as mesmas absorvâncias (e logo as mesmas concentrações). De qualquer modo, os resultados obtidos por este método permitem observar o aumento do teor de polissacáridos com o FCV, como seria espectável.

Para os ensaios com adição de concentrados obtidos a diferentes FCV, verifica-se uma certa concordância entre os valores de potenciais iniciais. Estes valores de potenciais são contudo superiores ao valor de potencial inicial registado para a solução modelo (318,5 mV).

Esta diferença considerável nos valores de potenciais, poderá estar relacionada com uma interferência na resposta do eléctrodo causada, eventualmente, pelos polissacáridos de maior massa molecular, ou eventualmente a um aumento da concentração de cálcio ionizado na solução, devido à presença de outros iões. McKinnon *et al.* (1996) observou que o ácido poligalacturónico afecta o potencial assimétrico da membrana, e que uma correcção deve ser aplicada neste caso. Contudo, uma análise ao cálcio total permitiria concluir mais a este respeito.

O permeado obtido por esta membrana demonstrou ter pouca influência no tempo de indução o que pode dever-se a:

1) o tipo de polissacáridos presentes nesta fracção (que segundo a literatura se espera que sejam MP de menor massa molecular e as RG's) não têm influência na inibição da precipitação.

2) os polissacáridos existentes neste precipitado, às concentrações em que estão presentes, não revelam nenhum efeito significativo sobre a nucleação.

A etapa seguinte pretendeu avaliar se os polissacáridos de menor massa molecular desempenham alguma influência na inibição da precipitação. Para tal, procedeu-se a um novo fraccionamento, com recurso à membrana FS61PP (20 kDa). A esta membrana foi alimentado o permeado resultante do ensaio de UF anterior (com a membrana FS40PP). Os polissacáridos presentes no concentrado e permeado após terem sido isolados com etanol foram adicionados à solução modelo a uma concentração igual de 200 mg/L, para efeitos comparativos.

Apresentam-se, na tabela 25, os resultados obtidos para estes ensaios.

Tabela 25. Efeito das fracções obtidas por UF com a membrana FS61PP (20 kDa) no tempo de indução (TI). Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140$ mg/L e $[Ácido\ tartárico] = 2,2$ g/L. Condições operatórias: $T = 15^{\circ}C$; velocidade de agitação = 850 rpm; $pH_{médio}$ indicado abaixo.

	Factor de concentração volumétrico (FCV)	Concentração do aditivo mg/L	$pH_{médio}$ até ao início da precipitação (% variação do pH face à solução modelo)	TI (min)
Solução modelo		0	3,587	13
Solução modelo com concentrado	2,5	200	3,515 (2%)	17
Solução modelo com permeado	2,5	200	3,540 (1,3%)	13

Observa-se pela tabela 25, que os polissacáridos presentes, quer no concentrado, quer no permeado demonstraram não ter influência no tempo de indução.

Por comparação dos potenciais obtidos para estes ensaios com os da solução modelo, observa-se que estes são menores (Figura 28).

As variações de força iónica que possam ter ocorrido após a adição destes polissacáridos à solução modelo, provavelmente não explicam o desfasamento observado. A variação registada pode dever-se ou à interferência destes polissacáridos com a resposta do eléctrodo, tal como foi sugerido no caso dos concentrados obtidos pela membrana FS40PP, ou à diminuição da concentração de cálcio, resultado do estabelecimento de uma ligação entre este e os polissacáridos em solução.

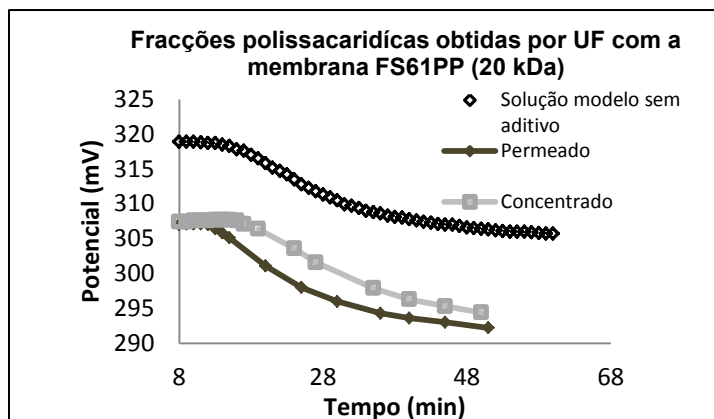


Figura 28. Representação gráfica do potencial em função do tempo para os ensaios com adição das fracções polissacarídicas, obtidas por UF com a membrana FS61PP (20 kDa), à solução modelo. Solução modelo 11%(v/v) em etanol com: $[Ca^{2+}] = 140 \text{ mg/L}$ e $[\text{Ácido tartárico}] = 2,2 \text{ g/L}$. Condições operatórias: $T = 15^\circ\text{C}$; velocidade de agitação = 850 rpm.

A primeira hipótese surge, contudo, como sendo a hipótese mais provável, dado que se o cálcio em solução sofresse esta diminuição, seria espectável que houvesse menos cálcio disponível para formar o CaT, e deste modo, o tempo de indução devia sofrer um maior atraso. O que não se verifica.

Segundo a tabela 2, é de esperar que os polissacáridos presentes no concentrado sejam as MP de menor massa molecular e a RG-I. A RG-I é apontada como um bom agente sequestrador do cálcio, devido quer à sua densidade de carga negativa como também devido a características estruturais (Pellerin *et al.* 2013). Contudo, a gama de concentrações indicada para este polissacárido no vinho tinto é baixa e varia entre 20-50 mg/L (tabela 2), pelo que a possível presença deste polissacárido não deve ser suficiente para explicar a diminuição do potencial observável na figura 28.

No permeado espera-se que esteja presente a RG II. Esta também se encontra presente no vinho tinto em teores baixos que podem variar entre 50-150 mg/L, pelo que o que foi referido anteriormente também se aplica a esta situação.

Para se retirarem mais conclusões sobre o efeito que cada polissacárido desempenha na precipitação do CaT seria necessário isolá-los por diferentes tipos de cromatografias.

8. Conclusões

O objectivo do presente trabalho consistiu na avaliação da influência de determinados compostos, a maioria existentes no vinho, na precipitação do CaT. A adição destes compostos foi feita a uma solução hidroalcoólica e os tempos de indução foram avaliados através de uma alteração na resposta do eléctrodo selectivo aos iões de cálcio.

Entre as várias classes de compostos, os ácidos orgânicos demonstraram ser a classe para a qual se obtiveram maiores atrasos no tempo de indução. Dos ácidos orgânicos existentes no vinho, testaram-se os seguintes: ácido láctico; ácido cítrico; ácido málico e ácido glucónico.

O ácido glucónico foi testado a concentrações que estão dentro da gama em que este pode estar presente no vinho. A estas concentrações, este ácido demonstrou ser um bom inibidor da precipitação do CaT dado que, durante o tempo de duração dos ensaios (cerca de 2 horas), não ocorreu precipitação. Este ácido é conhecido por ser um bom agente quelante do cálcio a pH alcalino. O facto de se ter obtido um grande atraso no tempo de indução aquando da adição deste ácido à solução modelo, pode indicar que, possivelmente, ocorre a ligação entre este composto e o cálcio ao valor de pH testado (oscilante entre 3,5). Estes valores de pH correspondem a valores característicos dos vinhos.

De entre os restantes ácidos orgânicos referidos verificou-se que o ácido láctico, comparativamente com o ácido cítrico e málico, tinha um menor poder inibitório. Assim fenómenos que ocorrem naturalmente no vinho, como a fermentação maloláctica, podem de algum modo favorecer a instabilidade associada à precipitação do CaT. Isto porque, neste fenómeno o ácido málico, que demonstrou ter um maior efeito no tempo de indução, é substituído por outro que revelou ter menor impacto (ácido láctico).

A nível estrutural verificou-se que a existência de um maior número de grupo carboxílicos não implica necessariamente um maior poder inibidor da precipitação, dado que o ácido glucónico com apenas um grupo carboxílico demonstrou ter, quando testado a concentrações molares similares, um maior impacto no tempo de indução do que o ácido cítrico que tem dois grupos carboxílicos.

O ácido galacturónico, pertencente à subclasse dos açúcares ácidos, demonstrou ter influência no tempo de indução. Esta influência demonstrou ser tão mais significativa quanto maior a concentração adicionada deste ácido.

Os compostos, abordados anteriormente, que revelaram ter influência na precipitação do CaT apresentam em comum o facto de terem grupos carboxílicos e hidroxilos na sua estrutura.

Outros compostos testados pertencentes a outras classes (aminoácidos; açúcares neutros e ácidos fenólicos) demonstraram não atrasar o tempo de início da precipitação.

Os aminoácidos e os ácidos fenólicos apesar de terem grupos carboxílicos na sua estrutura não revelaram atrasar a precipitação. O que pode estar relacionado com a incapacidade do cálcio se ligar a estes compostos, ao pH de estudo.

Os tempos obtidos em alguns ensaios com os ácidos fenólicos foram menores do que o obtido para a solução modelo, o que pode significar duas coisas: 1) ou estes compostos propiciaram ligeiramente a precipitação ou 2) o precipitado formado nestes casos não se tratava de CaT, mas sim de um sal de cálcio destes ácidos, que por, eventualmente, não serem muito solúveis acabaram por

precipitar. Por motivos de tempo, não se conseguiu realizar uma análise do precipitado, para esses casos.

Quanto aos parâmetros (m_1 e K_G'), pode referir-se que, quando estes apresentam uma variação contrária, será necessário a realização de mais ensaios, a caracterização dos precipitados e a quantificação da massa precipitada ao longo do tempo para permitir retirar mais conclusões e até decidir qual dos parâmetros é um melhor indicador da precipitação do CaT.

Os polissacáridos isolados a partir das fracções obtidas por ultrafiltração revelaram, no geral, não influenciar significativamente os tempos de indução. A influência mais notória ocorreu quando se adicionaram à solução modelo os precipitados polissacáridos (de maior massa molecular) obtidos aos factores de concentração volumétricos (FCV) de 4 e 4.5.

Para alguns ensaios, incluindo os realizados com adição dos precipitados polissacáridos obtidos por UF do vinho, visualizaram-se os cristais por microscopia óptica (Anexo 8), tendo-se observado que estes apresentam dimensões diferentes mas são visualmente muito semelhantes. Parece existir, uma semelhança entre os cristais observados e os apresentados na figura 5 do presente trabalho. Contudo apenas uma análise mais detalhada permitiria obter uma confirmação mais exacta. As análises de difracção de raio X realizadas, por motivos de tempo, apenas para algumas amostras (solução modelo e solução modelo com adição de ácido cítrico) demonstraram que o precipitado se trata de CaT.

9. Perspectivas de trabalho futuro

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho, conduziram a outras questões que para serem respondidas carecem de mais investigação. De seguida, e com este intuito, são sugeridas algumas perspectivas de trabalho futuro, tais como:

- Avaliar se a inibição na nucleação do CaT, demonstrada por alguns compostos, nomeadamente o ácido glucónico, se deve ao estabelecimento de uma ligação entre estes e o cálcio. Para tal, os compostos de interesse devem ser adicionados a uma solução hidroalcoólica contendo apenas cálcio (pH=3,5), de modo a avaliar se se regista uma diminuição do potencial com o tempo devida à diminuição dos iões de cálcio em solução.
- Reproduzir o trabalho experimental com uma solução modelo cujo pH seja mantido constante através do recurso a uma solução tampão (de pH =3,5), de modo a minimizar as oscilações de pH que têm tendência a ocorrer ao longo dos ensaios.
- Caracterização da composição dos permeados e concentrados obtidos no presente trabalho experimental e isolamento dos polissacáridos presentes nestas, de modo a estudar a influência destes na precipitação do CaT.
- Obtenção das velocidades de cristalização experimentalmente, através da remoção de alguns mL de amostra da solução de trabalho em intervalos regulares, filtração da mesma e análise do cálcio total por espectroscopia de absorção atómica de chama.
- Análise aos cristais obtidos, nos ensaios de precipitação realizados neste trabalho, por espectroscopia de infravermelhos e comparação do espectro obtido com o espectro de infravermelho obtido para a amostra comercial de CaT ou realização de análises adicionais de difracção de raio X (para complementar as que foram realizadas no presente trabalho).

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

10. Referências Bibliográficas

- Abgueuen, O. e Boulton, R.B., The crystalization kinetics of calcium tartrate from model solutions and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (1), pp 65-75 (1993) (citado por Mc.Kinnon *et al.* 1995 e Mira, H., 2004).
- Adams, D.O., Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal Enology and Viticulture*, 57 (3), 249-256 (2006).
- Andrade, M.J.C. Estabilização tartárica de vinhos tintos por combinação de nanofiltração e permuta catiónica. Tese de Mestrado. Universidade Católica Portuguesa, Porto (2012).
- Anónimo, Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. OIV, Paris (2014).
- Belleville, M.P., Brillouet, J.M, Tarodo de la Fuente, B., Moutounet, M. Fouling colloids during microporous alumina membrane filtration of wine. *J. Food Science*, 57 (2), 396-400 (1992).
- Berg, H.W. e Keefer, R.M., Analytical determination of tartrate stability in wine.I. Potassium bitartrate. *American Journal Of Enology and Viticulture*, 9 (4), pp 127-134 (1958) (Citado por Lasanta *et al.* 2012 e Mira, H., 2004).
- Berg, H.W. e Keefer, R.M., Analytical determination of tartrate stability in wine.II. Calcium tartrate. *American Journal Of Enology and Viticulture*, 10, pp 105-109 (1959) (Citado por Lasanta *et al.* 2012 e Mira, H., 2004).
- Blouin, J., Manuel Pratique d'Analyse des Moûts et des Vins. Ch. Agric. Gironde. Bordeaux (1973).
- Blouin, J., Les techniques de stabilization tartrique des vins par le froid. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 16, 63-77 (1982)
- Brett,C.; Waldron, K. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. London: Unwin Hyman, 194p (1990).
- Brissonnet, F., & Mauean A. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (3), 297-301 (1993).
- Cabrita, M.J., Ricardo-da-Silva, J., Laureno, O., Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. I Seminário Internacional de Vitivinicultura (2003).
- Cameira-dos-Santos, P.J., Cheynier, V., Brillouet, J.M., Cadot, Y., Escudier, J.L., Roesink, H.D.V., Moutounet M. Cross-flow filtration of wines with polymeric membranes: The influence of wine making technology and backpulse on the fouling process, *Prehambeno-tehnol. Biotehmol. Rev.* 32 (2-3), 77–83 (1994) (citado por Czekai, 2000)
- Cameira-dos-Santos *et al.* (2000) (citado por Colby (2007))
- Catarino, S., Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites. Tese de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia (2006).
- Catarino, S.; Curvelo-Garcia, A.S; Sousa, R.B. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. *Ciência Téc. Vitiv*, 23 (1), 3-19 (2008).
- Cheryan M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*, 2nd Edition. CRC Press, United States of America (1998).
- Crachereau J.C., Gabas N., Blouin J., Hebrard S. and Maujean A. *Bull. OIV*, 841–842, 151. (2001)
- Clark, J.; Fugelsang, K.; Gump, B., Factors Affecting Induced Calcium Tartrate Precipitation from Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 155-161 (1988).

Claus, H., Tenzer, S., Sobe, M., Sclander, M., König, H., Fröhlich, J. Effect of carboxymethyl cellulose on tartrate salt, protein and colour stability of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2014).

Colby, C., New technologies for tartrate stabilization- Field testing of nanofiltration. Research Organization: Chemical Engineering Department. The University of Adelaide (2007).

Cui, Z. F.; Muralidhara, H.S. *Membrane Technology. A practical Guide for Membrane Technology and Applications in Food and Bioprocessing*. 1st Edition, BH, United States of America (2010).

Curvelo-Garcia, A.S., *Controlo de qualidade dos vinhos. Química Enológica. Métodos Analíticos*. Ed. Instituto da Vinha e do Vinho (1988).

Czekai, P., López, F., Güell, C. Membrane fouling during microfiltration of fermented beverages. *Journal of Membrane Science*, 166, 199–212 (2000)

Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P. Structure of Plant Cell Walls VIII. New Pectic Polysaccharides. *Plant Physiology*, 62 (3), 418-422 (1978).

De Pinho, M.N.. *Membrane Processes in Must and Wine Industries. Membranes for Food Applications*, Peinemann K.-V, Pereira Nunes S., Giorno L. Ed. Wiley-VCH (2010).

DeSoto, R. & Yamada, H. Relationship of solubility products to long range tartrate stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 14, 43-51 (1963) (citado por Colby, 2007).

Doco, T., & Brillouet, J.M. Isolation and characterisation of a RhamnoGalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243(2), 333–343 (1993).

Doco, T., Williams, P., Moutonet, M., Pellerin P. Les polysaccharides du vin. *Bulletin de l'OIV.*, 73 (837-838), 785-792 (2000).

Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V.. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (16), 6643–6649 (2007).

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), (1956).

Escudier, J.L., Saint-Pierre, B., Batlle, J. L. & Moutonet, M. Procédé et dispositif automatique de stabilisation tartrique de vins. French Patent FR 2709308-A1.(1993).

Ducasse, M.-A.; Llauberes, R.-M.; Lumley, M.; Williams, P.; Souquet, J.-M; Fulcrand, H.; Doco, T.; Cheynier, V. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118, 369-376 (2010).

Feuillat, M. Stabilisation et clarification des vins: aspects colloïdaux, *Rev. Oenol*, 45, 8, (1987) (citado por Gonçalves *et al*, 2001).

Gerbaud V. D'étermination de l'état de sursaturation et effet des polysaccharides sur la cristallisation du bitartrate de potassiu dans les vins. Thèse de l'Université de Toulouse (I.N.P.) (1996) (citado por Ribéreau-Gayon, 2006).

Gerbaud, V., Gabas, N., Blouin, J., Pellerin, P., Moutonet, M. J. Effet des polysaccharides et des polyphenols du vin sur la cristallisation de L'Hydrogénotartrate de Potassium. *Int. Sci. Vigne Vin* , 31 (2), 65-83 (1997).

Gonçalves, F., Fernandes, C., De Pinho, M.N., White wine clarification by micro/ultrafiltration: effect of removed colloids in tartaric stability. *Separation and Purification Technology*, 22-23, 423–429 (2001)

Gonçalves, F., *Optimização da clarificação e Estabilização Tartárica de Vinhos por Processos de Membranas. Influência das macromoléculas e da composição iónica. Tese de Doutoramento. Instituto Superior Técnico* (2002).

Jackson, R.S., *Wine Science. Principles and applications*. Elsevier (2008).

Kennedy J.A., Saucier C., Glories Y. Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), 239-248 (2006).

Lasanta, C.; Gómez, J. Tartrate stabilization of wines. *Food Science & Technology*, 28, 52-59 (2012).

Lipnizki, F. *Cross-Flow Membrane Applications in the Food Industry, Membranes for Food Applications*. Ed: K.-V. Peinemann, S. Pereira Nunes and L. Giorno. Wiley-VCH (2010).

Llaubères, R. M., Dubourdieu, D., & Villettaz, J. C. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41, 277–286 (1987).

Lubbers S., Léger B., Charpentier C. and Feuillat M. J. *Int. Sci. Vigne Vin*, 271, 13 (1993) (citado por Ribéreau-Gayon, 2006).

Mannapperuma (2001) (Citado por Colby, 2007)

Maujean, A., Malherbe, V., & Dupont, A. (1984). Traitement par le froid artificiel des vins de Champagne. 1. Control des traitements par le froid artificiel des vins de Champagne. Efficacité des traitements selon la nature du collage des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 49-65 (1984).

Maujean, A., Saussy, L & Valée, D. Determination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdes-protecteurs. *Rev. Fr. OEnol*, 100, 39-50 (1985) (Citado por Gerbaud, 1997).

Marsh, G.L. e Joslyn, M.A., Precipitation rate of cream of tartar from wines. Effect of temperature. *Ind. Eng. Chem.*, 27, nº11, 1252-1257 (1935).

Mira, H. Influência da aplicação de resinas permutadoras de iões, PVI-PVP e proteínas vegetais nas características dos vinhos. Tese de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia (2004).

McKinnon, A.J., Scollary, G.R.; Solomon, D.H., Williams, P.J., The influence of wine components on the spontaneous precipitation of calcium L(+)-Tartrate in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 509-517 (1995).

McKinnon, A.J., Williams, P.J., Scollary, G.R. Influence of uronic acids on the Spontaneous Precipitation of Calcium L-(+) tartrate in a model wine solution. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1382-1386 (1996).

Moutounet, M. & Escudier, J.L. Tartaric stabilization of wines and electrodialysis: new prospects. *Australian Grapegrower and Winemaker* (332), 19-21 (1991).

Moutounet et al. (1997) (citado por Colby (2007))

Mulder M. *Basic Principles of Membrane Technology*, 2nd Edition. Kluwer Academic Publishers, Netherlands (1996).

Müller-Spath, La stabilisation du tarter avec le procédé par contact. *Revue Française d'Oenologie*, 73,41 (1979).

Ough, C.S., and M.A. *American Methods for Analysis of Must Wines* (2nd edition). p. 291. Wiley-Interscience, New York (1988) (citado por McKinnon *et al.*, 1995).

Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M. Characterization of five type II arabinogalactanprotein fractions from red-wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277, 135–143 (1995).

Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M., & O'Neill, M. A. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290, 183–197 (1996).

Pellerin, P., O'Neill, M.A., Pierre, C., Cabanis, M.T., Darvill, A., Albersheim, P., Moutounet, M. Le plomb est complexé dans les vins par les dimères de rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectique du raisin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 33–41 (1997).

Pellerin, P., Doco, T., Scollary, G. Original Article. The Influence of wine polymers on the spontaneous precipitation of calcium tartrate in a model solution. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2676-2682 (2013).

Postel, W., Solubilité et inhibition du cristallisation de tartrate de calcium dans le vin. *Bull. O.I.V.*, 56, pp 554–568 (1983).

Postel, W., La solubilité et la cinétique de cristallisation du tartrate de calcium dans le vin. *La Journée Vinicole*, 16688, 2-10 (1984).

Rankine, B. C. *Making good wine: a manual of winemaking practice for Australia and New Zealand*. Sydney: Macmillan. (2004) (citado por Colby (2007)).

Ramachandran, S.; Fontanille, P.; Pandey, A.; Larroche, C. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production (a review). *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2), 185-195 (2006).

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. and Ribéreau-Gayon P. *Sciences et Techniques du Vin*, Vol. IV: Clarification et Stabilization. Dunod, Paris (1977) (citado por Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Ribéreau-Gayon P. *Sciences et techniques du vin*. Tome 1 – Analyse et contrôle des vins. 2e édition. Dunod, Paris (1982) (citado por Catarino, S., 2006).

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. *Traité d'oenologie*. 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements. Dunod, Paris (1998).

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. *Handbook of enology*. Volume 2: The chemistry of wine. Stabilization and treatments. 2nd edition. John Wiley & Sons, Ltd. England (2006).

Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model – Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 17–23 (2002).

Scollary, G.R.; Hampson, D.; Pellerin, P.; Doco, T.; Waters, E. Polyuronic acids from veraison to the finished wine: Their role in calcium tartrate stabilization. Final Report. School of Chemistry. The University of Melbourne (1998).

Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; de la Torre-Boronat, M.C., Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 564-570 (1995).

Smith, V. Assessment of Cold Stabilization for tartaric acid in wine. Penn State Food Science Undergraduate (2012).

Spellman, M.W., McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P., Henrick, K., Dell, A. Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II, 122, pp 131-153 (1983).

Stevenson T.T., Darvill, A.G., Albersheim, P. 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. Carbohydrate Research, 179, 269-288 (1988).

Sponholz, W. R.; Dittrich, H. H. Galacturonic, glucuronic, 2- and 5-oxogluconic acids in wines, sherries, fruit and dessert wines. Vitis, 23, 214-224 (1984) (citado por McKinnon et al., 1996)

Vernhet, A., Pellerin, P.; Prieur, C.; Osmianski, J.; Moutounet, M. Charge Properties of Some Grape and Wine Polysaccharide and Polyphenolic Fractions. Am. J. Enol. Vitic., 47, 25-30 (1996).

Vernhet, A., Pellerin, P., Belleville, M.P, Planque, J., Moutounet, M. Relative Impact of Major Wine Polysaccharides on the Performances of an Organic Microfiltration Membrane Am. J. Enol. Vitic., 50, 50-56 (1999).

Vidal, S., Williams, P., O'Neill M.A., Pellerin, P., Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. Carbohydrate Polymer, 45, 315-323 (2001).

Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. Carbohydrate Polymers, 54, 439-447 (2003).

Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M.; Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. Food Chemistry, 85, 519-525 (2004).

Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J.M. A Saccharomyces manno protein that protects wine from protein haze. Carbohydrate Polymers, 23, 185-191 (1994).

York W.S., Darvill A.G., McNeil, M., Albersheim, P. 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is a Component of rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. Carbohydrate Research, 138 (1), 109-126. (1985)

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury. F.S. (1995). Wine analysis and production. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing (citado por Andrade, M.J.C., 2012).

11. Mediografia

Site do FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor> (Consultado em Maio de 2014)

Cameira dos Santos, P. O principio da electrodiálise. Fundamentos e aplicações em Enologia apresentação na estação vitivinícola Amândio Galhano. 4 de Junho Arco de Valdevez. Disponível em: <http://www.academia-vinhaevinho.com/ckfinder/userfiles/files/pt%202008%2005%2029a.pdf> (Consultado em Setembro 2014)

Moutounet, M., Bouissou, D. and Escudier, J.L. Effets de traitement de stabilisation tartrique de vins rouges par une gomme de cellulose (carboxymethylcellulose).
<http://technilire.net/documents/124963587/CMC%20sur%20rouges.pdf>. revue internet de viticulture et oenologie, 2010, n.6/2 (2010) (Consultado em Julho 2014)

12. Anexos

Anexo 1- Características das membranas de UF FS40PP e FS61PP

Flat Sheet Membranes

Ultrafiltration membranes

The range of ultrafiltration membranes from Alfa Laval covers a broad spectrum of flux properties and molecular weight cut-off values.

The membranes are based on a unique construction of polypropylene (PP) support material. All materials used for the production of these membranes comply with EU Commission Directive 2002/72/EC, FDA regulations (CFR) Title 21 and the membranes are thus suitable for use within food and pharmaceutical processing applications.

The Alfa Laval flat sheet membranes are available by the metre, as standard sheets (size 20 x 20 cm), and of course in all Alfa Laval plate-and-frame configurations.

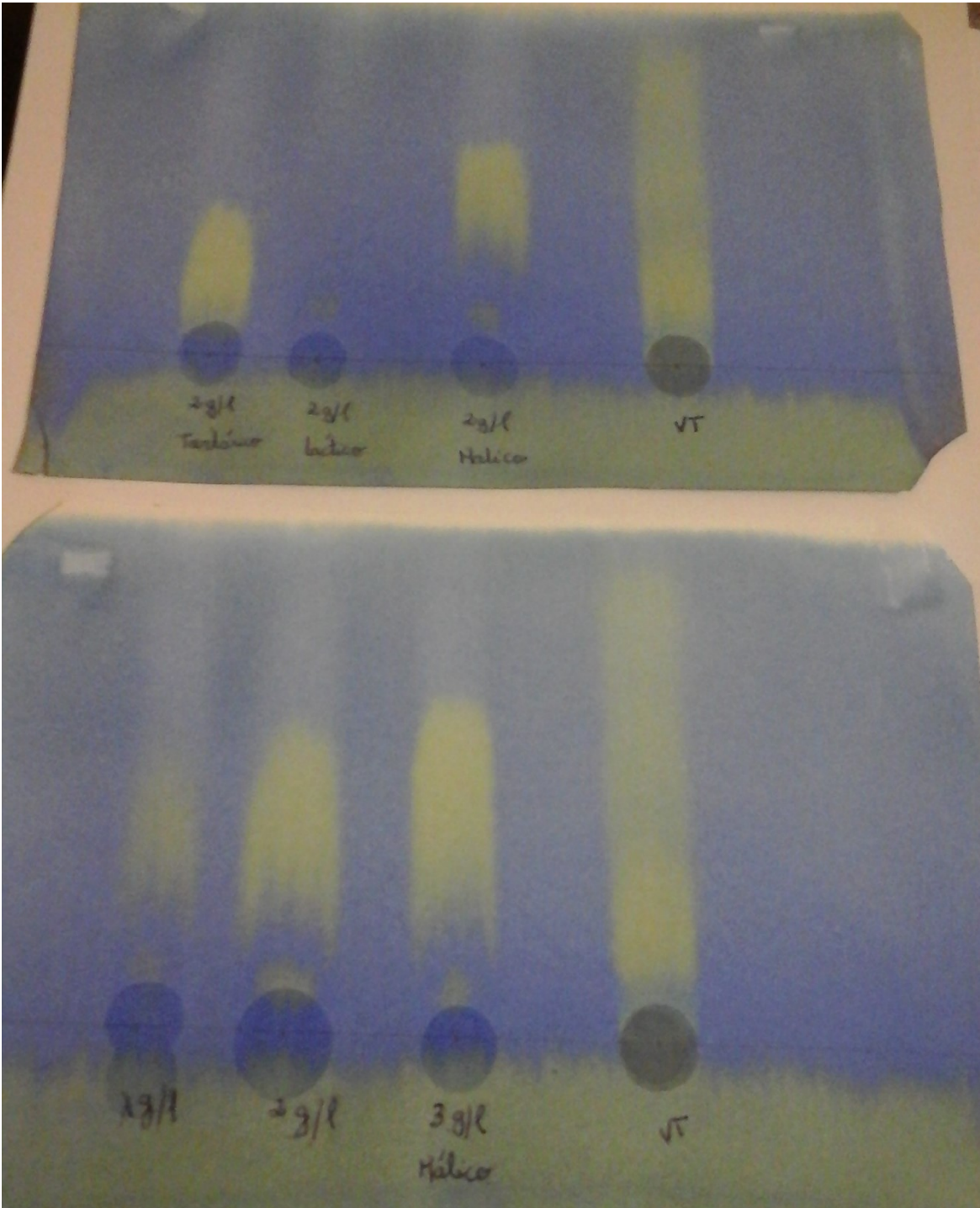
Designation	Process	Characteristics	MWCO
CA600PP	UF	Cellulose acetate	20,000
GR40PP	UF	Polysulphone	100,000
GR51PP	UF	Polysulphone	50,000
GR60PP	UF	Polysulphone	25,000
GR61PP	UF	Polysulphone	20,000
GR70PP	UF	Polysulphone	20,000
GR81PP	UF	Polyethersulphone	10,000
GR95PP	UF	Polyethersulphone	2,000
FS40PP	UF	Fluoro polymer	100,000
FS61PP	UF	Fluoro polymer	20,000
RC70PP	UF	Regenerated cellulose acetate	10,000
ETNA01PP	UF	Composite fluoro polymer	1,000
ETNA10PP	UF	Composite fluoro polymer	10,000



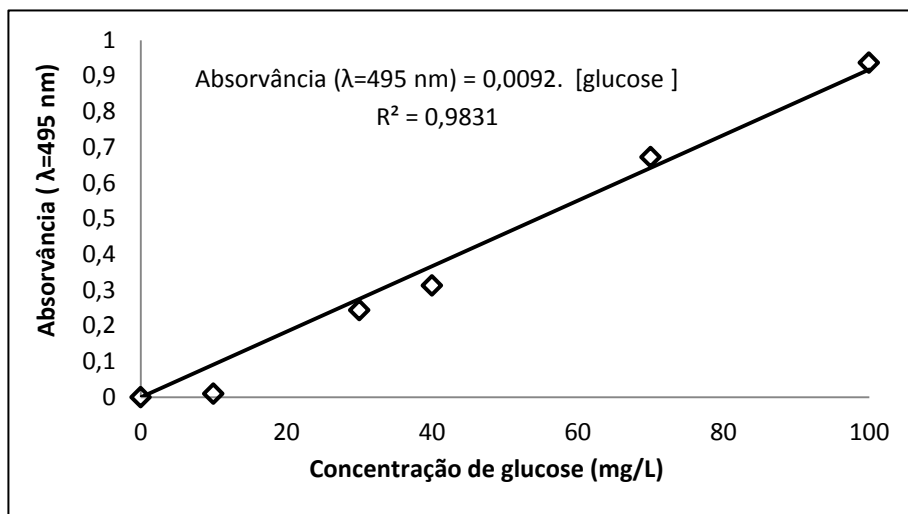
Recommended operation limits:

Production	CA	GR	FS	RC	ETNA
pH range	2-8	1-13	1-11	1-10	1-11
Pressure, bar (psi)	1-10 (15-145)	1-10 (15-145)	1-10 (15-145)	1-10 (15-145)	1-10 (15-145)
Temperature, °C (°F)	0-50 (32-122)	0-75 (32-167)	0-60 (32-140)	0-60 (32-140)	0-60 (32-140)
Cleaning (3 hours per day)* pH range	2-8.5	1-13	1-11.5	1-11.5	1-11.5
Pressure, bar (psi)	1-5 (15-73)	1-5 (15-73)	1-5 (15-73)	1-5 (15-73)	1-5 (15-73)
Temperature, °C (°F)	0-50 (32-122)	0-75 (32-167)	0-65 (32-149)	0-60 (32-140)	0-65 (32-149)

Anexo 2- Resultados obtidos da Pesquisa Maloláctica por cromatografia em papel



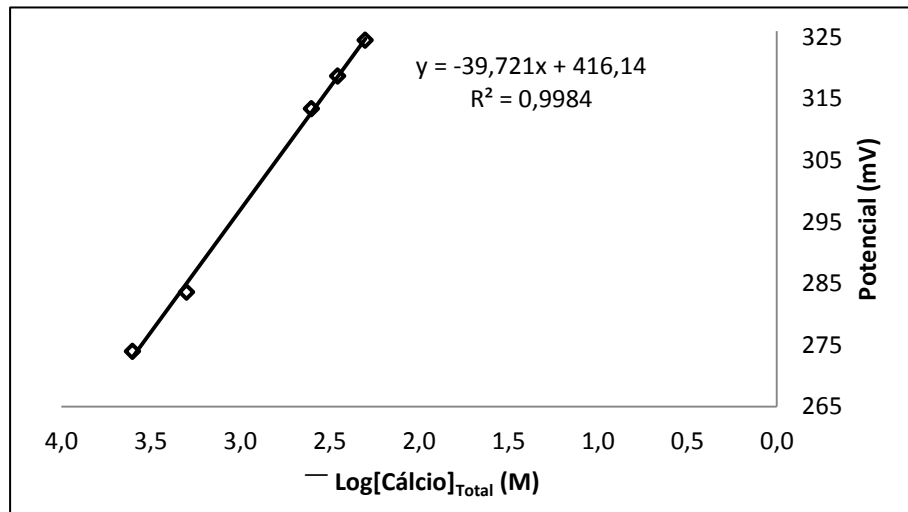
Anexo 3- Recta de calibração que relaciona a absorvância com a concentração de glucose (Método fenol-sulfúrico)



Anexo 4 – Representações gráficas

Anexo 4A

- Recta de calibração que relaciona os potenciais com a concentração de cálcio (Condições operatórias consideradas para traçar a recta de calibração: T=15°C, velocidade de agitação: 850 rpm)



Anexo 4B

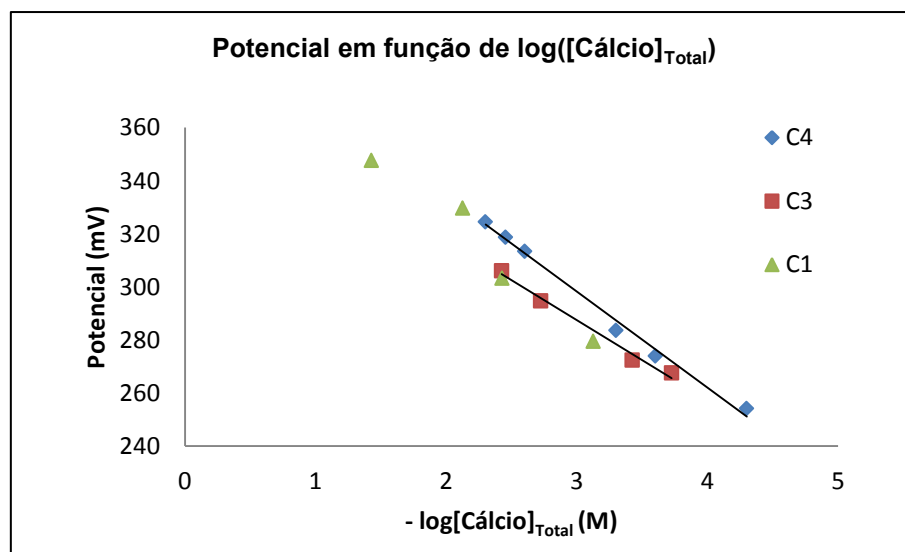
Legenda dos gráficos apresentados:

C4- Curva de calibração com cálcio e ácido tartárico

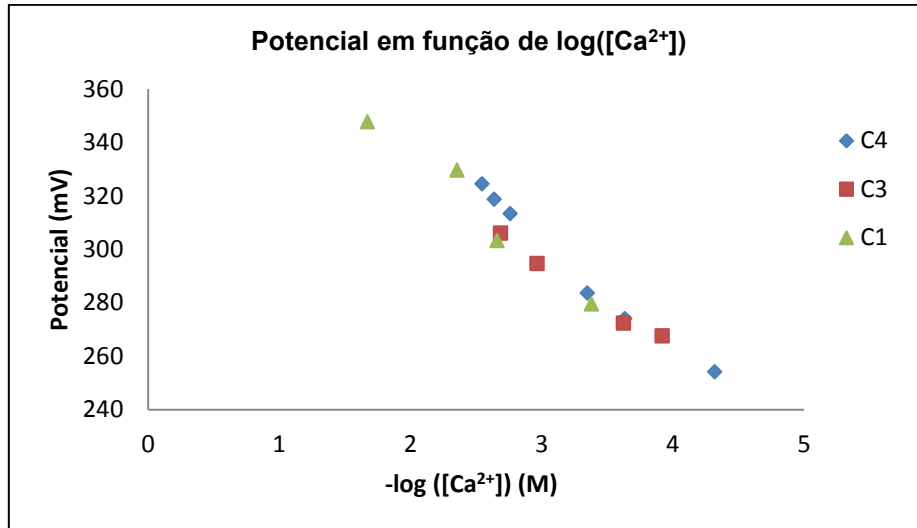
C3- Curva de calibração com cálcio e ácido tartárico

C1- Curva de calibração com cálcio

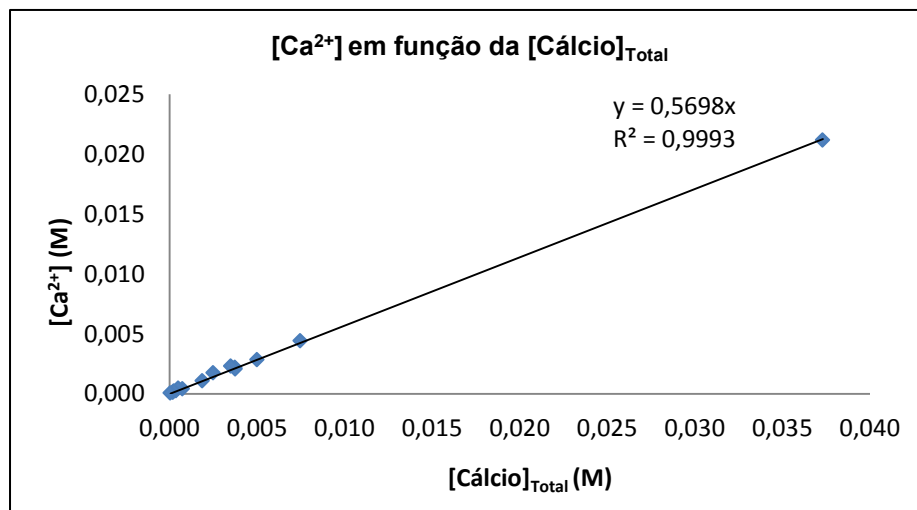
- Representação gráfica das curvas de calibração (C1,C3,C4) em função do logaritmo da concentração de cálcio total.



- Representação gráfica das curvas de calibração (C1,C3,C4) em função da concentração de cálcio ionizado (Ca^{2+}), em que as concentrações de Ca^{2+} foram obtidas pelo software *MinTeq*.

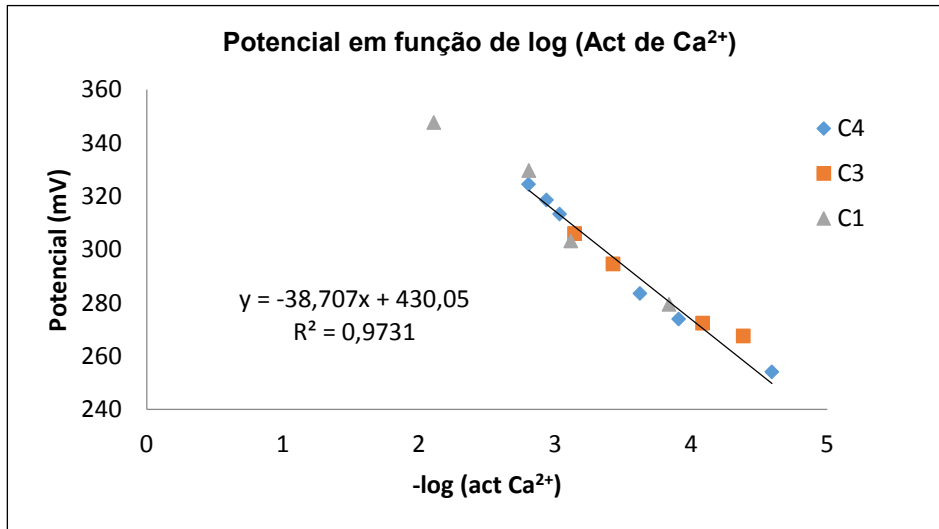


- Representação gráfica da concentração de cálcio ionizado em função do cálcio total



Por esta representação gráfica observa-se que a relação entre a concentração de cálcio ionizado e a concentração de cálcio total é a seguinte: $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Ca}_{\text{total}}] = 0,60$.

- Representação gráfica das curvas de calibração (C1,C3,C4) em função da actividade do cálcio ionizado (Ca^{2+}), em que as actividades de Ca^{2+} foram obtidas pelo software *MinTeq*.



• Dados obtidos para a solução modelo a partir do software *MinTeq*

No. of iterations

pH
 Ionic strength

Sum of cations (eq/kg)
 Sum of anions (eq/kg)
 Charge difference (%)

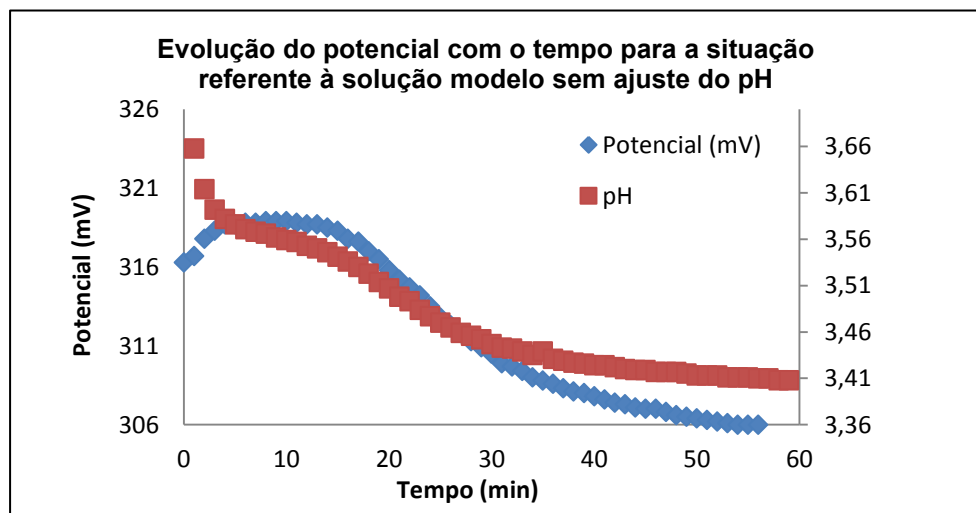
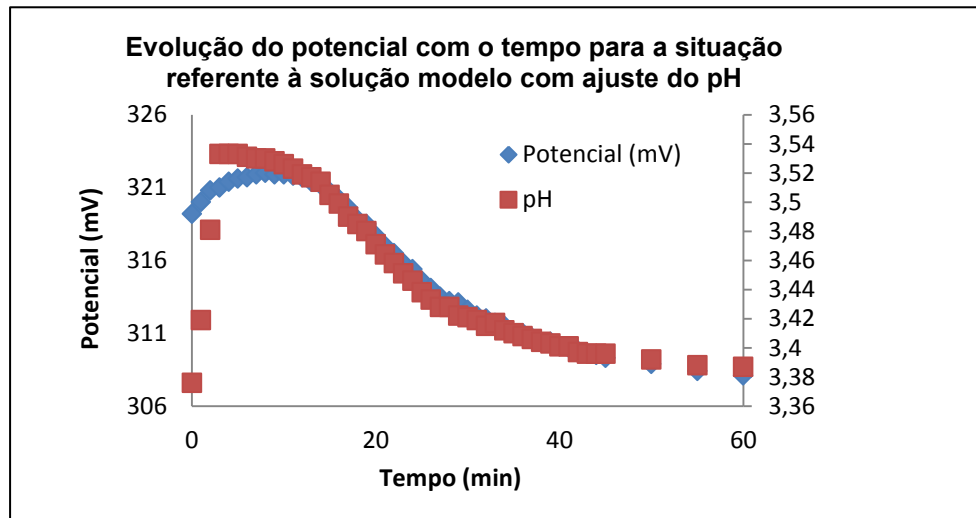
Concentrations and activities of aqueous inorganic species (mol / l)

	Concentration	Activity	Log activity
Ca+2	2.3103E-03	1.1599E-03	-2.936
CaCl+	7.3346E-05	6.1740E-05	-4.209
CaH-Tartrate+	3.4085E-04	2.8692E-04	-3.542
CaOH+	3.5644E-13	3.0004E-13	-12.523
Ca-Tartrate (aq)	7.7551E-04	7.8198E-04	-3.107
Cl-1	2.6624E-02	2.2411E-02	-1.650
H+1	3.7567E-04	3.1623E-04	-3.500
H2-Tartrate (aq)	2.5160E-03	2.5370E-03	-2.596
H-Tartrate-	8.4236E-03	7.0907E-03	-2.149
Na+1	1.9356E-02	1.6293E-02	-1.788
NaCl (aq)	2.0300E-04	2.0469E-04	-3.689
NaH-Tartrate (aq)	1.9286E-04	1.9447E-04	-3.711
NaOH (aq)	2.8007E-13	2.8241E-13	-12.549
Na-Tartrate-	1.4852E-04	1.2502E-04	-3.903
OH-	1.7299E-11	1.4561E-11	-10.837
Tartrate-2	1.9027E-03	9.5527E-04	-3.020

Componente	Concentração Total (%)	Nome das espécies
Tartrate-2	13,3	Tartrate-2
	1,0	Na-Tartrate-
		NaH-Tartrate
	1,3	(aq)
	58,9	H-Tartrate-
	17,6	H2-Tartrate (aq)
	5,4	Ca-Tartrate (aq)
Na+1	2,4	CaH-Tartrate+
	97,3	Na+1
	0,7	Na-Tartrate-
		NaH-Tartrate
	1,0	(aq)
Cl-1	1,0	NaCl (aq)
	99,0	Cl-1
	0,3	CaCl+
Ca+2	0,8	NaCl (aq)
	66,0	Ca+2
	2,1	CaCl+
	22,2	Ca-Tartrate (aq)
	9,7	CaH-Tartrate+

Anexo 5- Evolução do potencial com o pH

Evolução simultânea do potencial e do pH, para a solução modelo com e sem ajuste de pH, e uma possível explicação para o aumento do potencial inicial.



As duas representações gráficas apresentadas acima permitem observar que:

- O valor de potencial inicial pode estar relacionado com o $pH_{inicial}$ da solução.
- O pH atinge um valor constante até se iniciar a precipitação de CaT. Esta observação parece estar de acordo com o ilustrado na **figura 6**.

Anexo 6 - Tabela resumo na qual constam as constantes de dissociação de cada aditivo considerado neste trabalho e a respectiva força iónica calculada

Aditivo	K _{a1}	K _{a2}	K _{a3}	[Aditivo] (mol/L)	Força Iónica aditivo (M)
Ácido Cítrico	7,45E-04	1,73E-05	4,20E-07	0,0013	1,76E-03
				0,0067	5,94E-03
				0,02	1,62E-02
Ácido Málico	3,48E-04	8,00E-06		0,01	6,29E-03
				0,021	1,23E-02
Ácido Láctico	1,38E-04			0,026	8,69E-03
				0,035	1,14E-02
Ácido Galacturónico	3,39E-04			0,0016	1,62E-03
				0,0047	3,22E-03
				0,02	1,11E-02
Arabinose	3,47E-13			0,0005	7,91E-04
				0,003	7,91E-04
Ramnose	5,01E-12			0,002	3,17E-11
				0,008	1,27E-10
Ácido Glucónico	1,99E-04			0,005	1,93E-03
				0,0092	3,55E-03
Ácido Hidroxibenzóico	2,90E-05			0,00022	1,85E-05
				0,011	9,24E-04
Ácido Vanílico	3,16E-05			0,0002	1,82E-05
				0,005	4,54E-04
Ácido p-coumárico	3,16E-05			0,0002	1,82E-05
					1,82E-05
Ácido trans-cinâmico	3,16E-05			0,0002	1,82E-05
Ácido salicílico	1,07E-03	1,51356E-14		0,0002	1,54E-04
				0,005	3,86E-03
Ácido gálico	6,31E-05			0,005	8,32E-04
				0,01	1,66E-03
Ácido benzóico	6,31E-05			0,002	3,33E-04
				0,02	3,33E-03
Ácido 2-clorobenzóico	1,20E-03			0,005	3,96E-03
Ácido adípico	3,72E-05	3,89E-06		0,0067	7,25E-04
Dihidrogenofosfato de amónio	7,50E-03	6,20E-08	2,20E-13	0,0043	4,13E-03
				0,02	1,92E-02
Ácido glutâmico	5,00E-05			0,0027	3,69E-04
				0,01	1,37E-03
Ácido aspártico	1,02E-02	1,26E-04	1,26E-10	0,004	5,59E-03
				0,02	2,79E-02
Glicina	4,57E-03			0,01	9,35E-03
Treonina	8,13E-03	7,94E-10		0,02	1,54E-02
Serina	6,46E-03	6,17E-10		0,02	1,61E-02

Anexo 7 - Parâmetros m_1 e K'_G determinados para os ensaios de precipitação (sem e com aditivos)

Solução modelo	Concentração do aditivo (g/L)	$T_{indução}$ (min)	$\frac{T(indução\ sol.modelo)}{T(indução\ sol.\ modelo\ sem\ aditivo)}$	Força iônica (M)	m_1	K'_G	$\frac{m_1/m_1}{standard\ sol.\ modelo}$	$\frac{K'_G/K'_G}{sol.modelo}$	ΔP_{ensaio} (mv)	$P_{equilíbrio}$ (mV)
Solução modelo sem aditivo	0	13	1	0,038	-0,433	0,091	—	—	13,2	306
Solução modelo com ácido cítrico	0,3	15	0,87	0,039	-0,417	0,062	0,962	0,685	13,1	306
	1,4	27	0,48	0,044	-0,205	0,037	0,473	0,402	10,8	306
	3,8	67	0,19***	0,054	-0,067	0,025	0,154	0,276	6,5	307
Solução modelo com ácido málico	1,4	26	0,50	0,044	-0,233	0,037	0,539	0,404	11,8	308
	3	93	0,14***	0,05	-0,067	0,013	0,154	0,146	6,9	309
Solução modelo com ácido láctico	2,3	15	0,87***	0,046	-0,281	0,042	0,650	0,460	11,2	304
	3,1	18	0,72	0,049	-0,292	0,036	0,674	0,393	10,7	304
Solução modelo com ácido adípico	0,979	13	1	0,038	-0,292	0,064	0,675	0,707	14,4	303
Solução modelo com ácido 2-clorobenzóico	0,783	9	1,44*	0,042	-0,721	0,113	1,666	1,246	11,4	293
Solução modelo com ácido trans-cinâmico	0,03	11	1,18*	0,038	-0,462	0,058	1,067	0,637	14,2	299
Solução modelo com ácido benzóico	0,03	12	1,08	0,038	-0,443	0,077	1,024	0,842	16,2	304
	0,02	4	3,25*	0,038	-1,3	0,05	3,000	0,555	50,3	214,7
Solução modelo com ácido galacturônico	0,35	19	0,68	0,039	-0,270	0,050	0,624	0,548	9,5	309
	1	24	0,54	0,041	-0,245	0,022	0,566	0,241	11,8	304
	3,88	97	0,13	0,049	-0,018	0,011	0,042	0,121	2,2	319
Solução modelo com arabinose	0,08	13	1	0,039	-0,503	0,079	1,162	0,868	13,1	306
	0,4	13	1	0,039	-0,524	0,079	1,211	0,867	15,3	304
Solução modelo com ramnose	0,36	13	1	0,038	-0,473	0,083	1,093	0,915	14,7	307
	1,4	13	1	0,038	-0,589	0,057	1,361	0,627	16,2	304
Solução modelo com dihidrogenosfosfato de amônio	0,5	15	0,87	0,042	-0,347	0,035	0,801	0,389	14,8	305
	2,3	16	0,81	0,057	-0,467	0,091	1,077	0,997	9,3	308

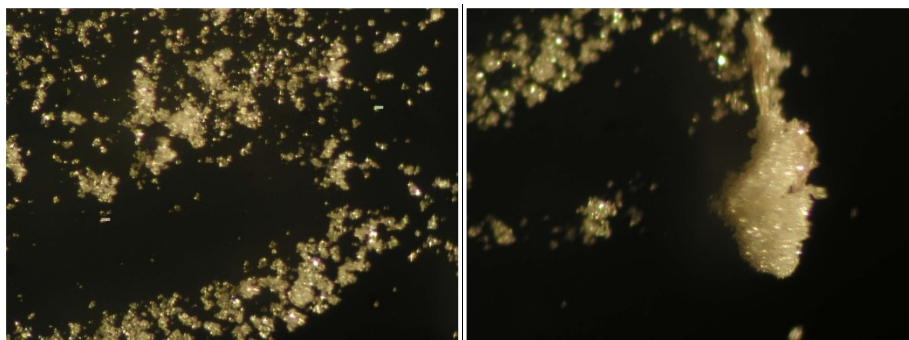
Solução modelo	Concentração do aditivo (g/L)	T _{indução} (min)	$\frac{T(\text{indução sol.modelo})}{T(\text{indução sol. modelo sem aditivo})}$	Força iônica (M)	m ₁	K _G '	m ₁ /m ₁ standard sol. modelo	K _G '/K _G sol.modelo	ΔP _{ensaio} (mv)	P _{equilíbrio} (mV)
Solução modelo com ácido hidroxibenzoico	0,03	9	1,44*	0,038	-0,288	0,057	0,666	0,626	8,1	295
	0,15	12	1,08*	0,039	-0,448	0,065	1,033	0,710	11,5	289
Solução modelo com ácido vanílico	0,03	13	1	0,038	-0,368	0,079	0,851	0,867	11,3	302
	0,84	11	1,18*	0,038	-0,670	0,153	1,547	1,679	7,5	290
Solução modelo com ácido p-coumárico	0,03	11	1,18*	0,038	-0,487	0,106	1,124	1,169	14,2	297
Solução modelo com ácido salicílico	0,03	9	1,44**	0,038	-0,440	0,026	1,016	0,282	18,6	301
	0,69	4	3,25**	0,042	-0,790	0,111	1,823	1,216	26,2	251
Solução modelo com ácido gálico	0,851	11	1,18*	0,039	-0,576	0,114	1,331	1,247	13,1	290
	1,7	11	1,18*	0,039	-0,616	0,118	1,423	1,301	10,8	270
Solução modelo com ácido glutâmico	0,39	12	1,08*	0,038	-0,510	0,089	1,178	0,982	12,4	302
	1,47	13	1	0,039	-0,610	0,089	1,409	0,977	11,6	304
Solução modelo com ácido aspártico	0,535	15	0,87	0,043	-0,677	0,076	1,564	0,833	14,4	300
	2,66	10	1,30	0,066	-0,739	0,161	1,706	1,766	8,1	314
Solução modelo com treonina	1,91	13	1	0,053	-0,647	0,065	1,493	0,714	14,8	301
Solução modelo com serina	1,775	17	0,76	0,054	-0,425	0,055	0,982	0,604	11,8	307
Solução modelo com glicina	0,751	13	1	0,047	-0,429	0,081	0,991	0,887	16	298
Solução modelo com agár	0,5	20	0,65	_____	-0,380	0,087	0,876	0,954	9,1	314

* Nas situações em que se verifica um aceleração no tempo de indução mas o potencial não varia muito, provavelmente o precipitado é o CaT;

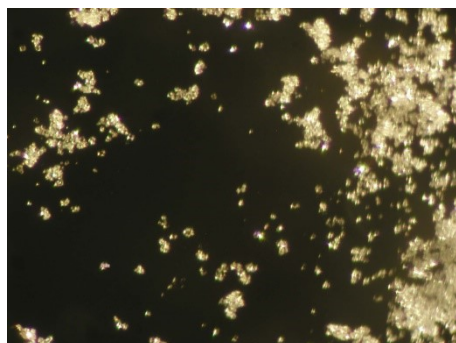
** Nas situações em que se verifica um aceleração no tempo de indução mas se obtêm potenciais de equilíbrio muito diferentes pode indicar que, nesses casos, o que precipitou pode não ter sido o CaT. Desta forma, o que pode ter, eventualmente, precipitado teria uma solubilidade diferente e daí que não se tenha atingido a mesma concentração de Ca²⁺.

*** As espécies assinaladas apresentam concentrações molares de 0,02 M (o ácido láctico apresenta aproximadamente este valor), sendo observável que no caso do ácido láctico o atraso no tempo de indução é menor do que o verificado para os outros dois ácidos assinalados. Este revela, comparativamente com os outros, influenciar menos a velocidade de precipitação (m₁). Para os ácidos málico e cítrico, que revelaram ter um bom efeito no atraso do tempo de indução, mas distinto, com o ácido málico a revelar-se mais influente do que o cítrico. Apresentam, no entanto e segundo os valores que constam na tabela, uma velocidade de precipitação (m₁) igual, o que sugere que têm o mesmo impacto na redução da velocidade de precipitação.

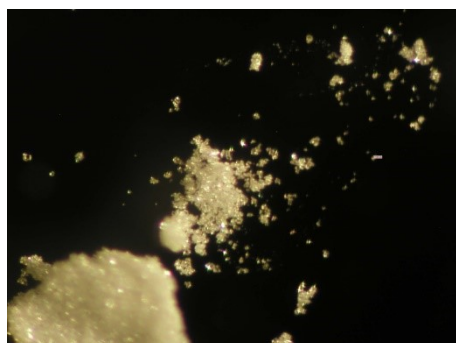
Anexo 8 - Imagens dos cristais obtidas, para alguns ensaios, por recurso a um microscópio óptico



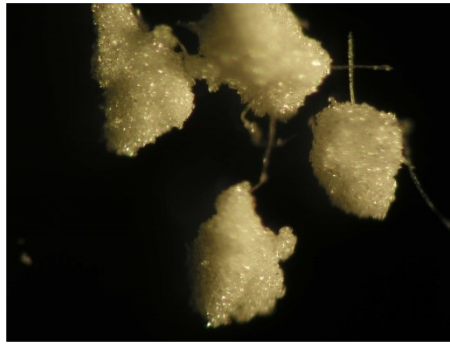
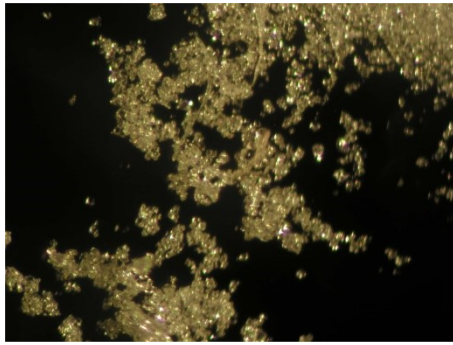
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com os polissacáridos isolados do concentrado a FCV=1,5 (Membrana FS40PP (100 kDa)).



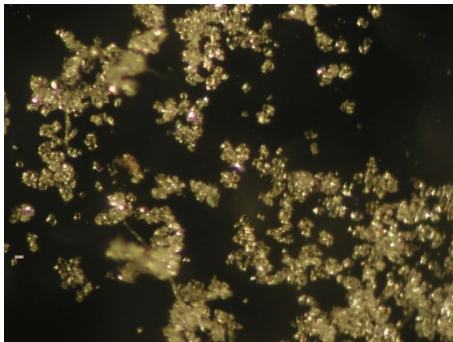
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com os polissacáridos isolados do concentrado a FCV=2 (Membrana FS40PP (100 kDa)).



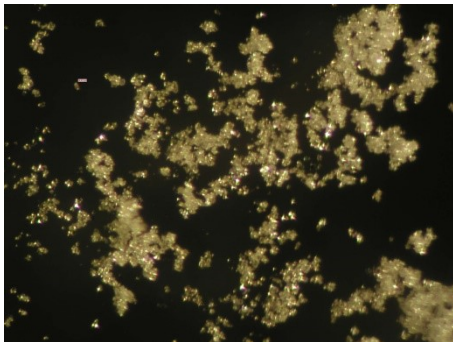
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com os polissacáridos isolados do concentrado a FCV=3 (Membrana FS40PP (100 kDa)).



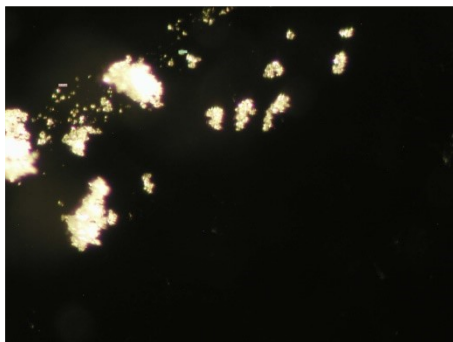
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com os polissacáridos isolados do concentrado a FCV=4 (Membrana FS40PP (100 kDa)).



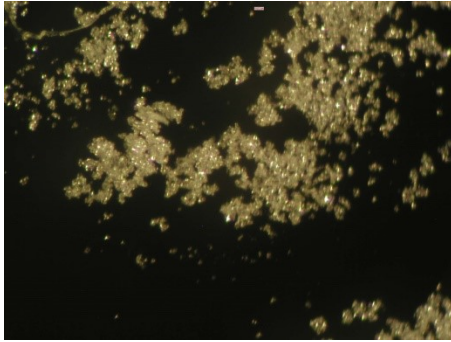
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com os polissacáridos isolados do concentrado a FCV=4,5 (Membrana FS40PP (100 kDa)).



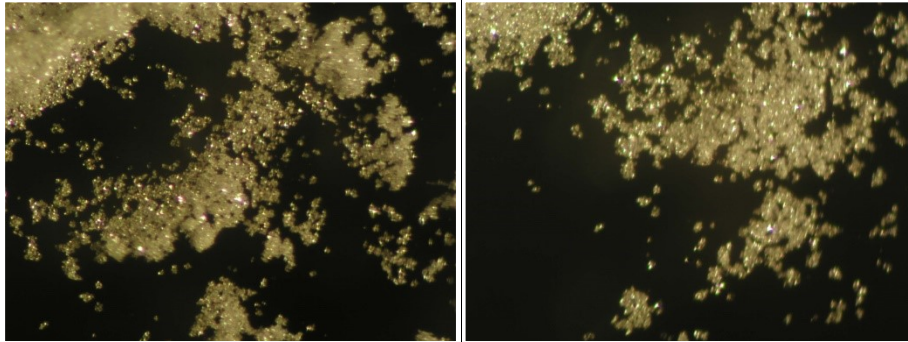
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com o ácido glutâmico.



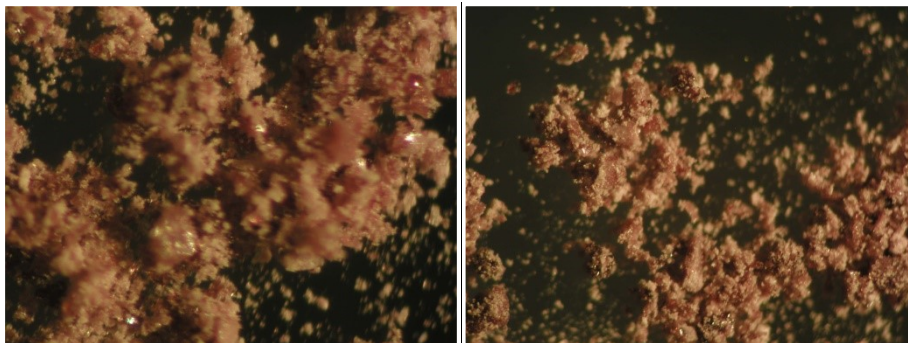
Cristais obtidos do ensaio de precipitação com o ácido vanílico.



Cristais obtidos do ensaio de precipitação com a glicina.



Cristais obtidos do ensaio de precipitação com o ácido gálico



Cristais depositados no fundo do permeado obtido ao FCV=4,5

* **Comentário:** Após a remoção dos polissacáridos de maior massa molecular, com a membrana FS40PP (100 kDa), o vinho ficou mais empobrecido a nível da composição polissacarídica, podendo tal ter propiciado a precipitação dos cristais que, por análise de difracção de RX, demonstraram tratar-se de KHT.