



M 2023

CARATERIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM AGENTE DE ESTABILIZAÇÃO DE CÁLCIO EM VINHOS DO PORTO

CAROLINA SEABRA OLIVEIRA DE ANDRADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado em Engenharia Química

Caraterização e Implementação de um Agente de Estabilização de Cálcio em Vinhos do Porto.

Dissertação de Mestrado

de

Carolina Seabra Oliveira de Andrade

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Symington Family Estates, Vinhos S.A. / Laboratório de Controlo de Qualidade De Vinhos



Orientador na FEUP: Prof. Manuel Simões

Coordenador na Symington Family Estates, Vinhos S.A.: Eng. Ana Silva



julho de 2023

Agradecimentos

Ao Eng. João Pedro Ramalho pela oportunidade de realizar a minha dissertação na Symington Family Estates, Vinho S.A.

Ao Nuno Moreira, pelo apoio e por ter tido um papel fundamental na minha entrada na empresa, pela simpatia e disponibilidade.

À Eng. Ana Silva pelo carinho, disponibilidade, paciência e acessibilidade. Por me apoiar em todas as etapas do trabalho, por me transmitir conhecimento dentro e fora de horas e por me ter acompanhado de forma incansável durante esta fase.

À Eng. Geraldina Cêa pela confiança, sinceridade e apoio.

À Patrícia por ter “perdido tempo” comigo, por me ter ensinado os procedimentos do laboratório mesmo quando as dúvidas eram muitas, por me apoiar quando as coisas não davam certo e por ter tornado a minha experiência mais alegre e divertida.

À Celeste e à Alexandra por me deixarem totalmente à vontade para pedir ajuda. Ao Ricardo por me ajudar a procurar alternativas, melhorar procedimentos e arranjar explicações para resultados menos bons; por todo o conhecimento transmitido de assuntos extra dissertação, mas com importância para um possível percurso na área. Ao Luís e ao João por terem partilhado esta experiência comigo.

Ao Prof. Manuel Simões pela orientação, disponibilidade e por todas as sugestões de melhoria.

Ao Prof. Francisco Malcata que me apoiou desde o início do mestrado e que me fez interessar pela área da Engenharia Alimentar. Por todo o conhecimento transmitido e pela ajuda em momentos de maior nervosismo.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por me apoiarem incondicionalmente nos momentos bons e naqueles em que a vontade de desistir era muita. Pela compreensão em todas as épocas de exames e por fazerem tudo para me ver feliz. Por serem os melhores do mundo!

Ao André por estar sempre lá, por ter uma palavra de motivação e um abraço de conforto, por me apoiar nos momentos de maior pressão e por me acompanhar em noites de estudo. Obrigada.

À Francisca L., Mariana V., Inês e Filipa pela amizade, por acompanharem o meu percurso e por me apoiarem sempre. Ao resto do meu grupinho por fazerem parte da minha vida. À Viviana por dizer o certo no momento certo, e por ter mais confiança em mim do que eu própria. À Francisca M., pelo carinho, por todos os dias e noites de estudo, por todos os relatórios, por toda a ajuda e por viver todo este percurso comigo. Desde o início e até ao fim, tal como prometemos! À Rita B., à Mariana G., à Teresa e à Ana por todos os bons momentos que passamos durante estes 5 anos. À Rita V. por ter aparecido a meio do meu percurso e se tornar tão importante na minha vida.

Obrigada à minha família e amigos por quem sou extremamente grata! Estou rodeada das pessoas certas.

Um obrigada especial ao “bú” Fernando e à “bó” Mila, que iam ficar orgulhosos por ver a neta a tornar-se Engenheira.

Resumo

O aparecimento de cristais de tartarato de cálcio em vinhos do Porto engarrafados, embora não represente um perigo para a saúde humana, é visto como um problema de qualidade que, por alterar a perceção por parte dos consumidores, pode levar à sua desvalorização. Várias são as possibilidades de tratamento, que removem algum do cálcio em solução e diminuem os riscos de instabilidade por sobressaturação, no entanto, todas elas apresentam alguma desvantagem que impede a sua utilização por parte das empresas produtoras de vinho. O tartarato de cálcio micronizado é um produto recente, apresentado como solução para esta problemática, mas que foi desenvolvido especificamente para vinhos de consumo. De forma a testar a sua eficiência no tratamento de vinhos do Porto, que apresentam maior complexidade de matriz, foi feita a sua aplicação em vinhos que apresentaram instabilidade pelos métodos de avaliação desenvolvidos pelo laboratório produtor do tartarato de cálcio micronizado. Por não ser totalmente esclarecedor em relação a condições específicas de aplicação e por não serem aplicáveis em armazém as condições de filtração sugeridas, determinou-se, numa primeira fase, o tempo de agitação e de repouso que levariam à maior remoção de cálcio; assim como o método de filtração equivalente mais eficiente. Concluiu-se que uma hora de agitação e 15 dias de repouso causaram a uma maior remoção de cálcio e optou-se por uma filtração com placa de celulose AF 70 seguida de um filtro, também de celulose, com 1,2 μm de porosidade. As garrafas submetidas a análise sensorial foram filtradas apenas com filtros de celulose, de porosidades decrescentes (1-6 μm ; 5 μm ; 3 μm e 1,2 μm), evitando a adição de aromas indesejados ao vinho e permitindo uma correta avaliação da influência do tratamento nas propriedades organoléticas. Por comparação do teor em cálcio no vinho antes e após o tratamento com diferentes doses de tartarato de cálcio micronizado, constatou-se que o produto não representa uma solução para o tratamento de instabilidade tartárica, uma vez que não foi capaz de remover nenhum do cálcio em solução. Sendo assim, é necessária a exploração de outras alternativas, de forma a dar resposta ao problema proposto.

Palavras-Chave: Cálcio, Cristalização, Instabilidade Tartárica, Tartarato de Cálcio, Vinho do Porto

Abstract

The appearance of calcium tartrate crystals in bottled Port wines is considered a quality issue that, although it does not pose any risk to human health, can negatively affect consumer perception and lead to the devaluation of the product. There are several possible treatments to remove calcium from the solution and reduce the risk of instability by supersaturation, however, they present certain disadvantages that prevent their use by wine companies. One promising solution that has been recently introduced is micronized calcium tartrate, but its application was specifically developed for consumption wines. In order to test its efficacy in the treatment of Port Wines, which matrix is much more complex, its application was tested in wines that presented instability according to the evaluation methods suggested by the supplier. Due to a certain unclarity regarding the application conditions and the impracticality of the suggested filtration requirements in the warehouse setting, the agitation time, resting period and filtration method were initially chosen to maximize the calcium removal. Therefore, it was determined that the best treatment conditions were 1 h agitation followed by 15 days of rest and a filtration using a AF 70 cellulose plate and a 1.2 μm porosity cellulose filter. To find the best filter, a sensory analysis was performed on the content of each bottle and several porosities were tested (1-6 μm ; 5 μm ; 3 μm and 1,2 μm). In order to avoid the alteration of the wine flavor by the addition of undesired aromas and allowing a correct evaluation of the influence of the treatment on the organoleptic properties, only cellulose filters were used. By comparing the calcium content in the wine before and after treatment with different doses of micronized calcium tartrate, it was found that the product does not provide a solution for the treatment of tartaric instability, as it was unable to remove any of the calcium in solution. Therefore, the exploration of other alternatives is necessary in order to address the proposed problem.

Keywords: Calcium, Crystallization, Tartaric Instability, Calcium Tartrate, Port Wine

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Assinar e datar

Carolina Seabra Oliveira de Andrade

03.07.2023

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa	1
1.3	Organização da Dissertação	2
2	Contexto e Estado da Arte	3
2.1	O Vinho em Portugal	3
2.2	O vinho do Porto	4
2.2.1	Breve Descrição do Processo de Produção do Vinho do Porto	4
2.2.2	Diferentes Tipos de Vinho do Porto	5
2.2.3	Composição do Vinho do Porto	6
2.3	Instabilidade Tartárica	9
2.3.1	Precipitações Tartáricas	10
2.3.2	Processo de Cristalização	13
2.4	Estabilização Tartárica	15
2.4.1	Avaliação da Estabilidade Tartárica nos Vinhos	18
2.5	Estabilização da Matéria Corante	19
3	Materiais e Métodos	21
3.1	Seleção e Preparação dos Vinhos de Teste	21
3.2	Testes de Estabilidade	22
3.3	Tratamento com CaT Micronizado	23
3.3.1	Teste de Variáveis	23
3.3.2	Aplicação do Produto para Tratamento	24
3.3.3	Filtração	24
3.4	Análise Físico-Química	27
3.4.1	pH	27
3.4.2	Acidez Total	27
3.4.3	Concentração de Ácido Tartárico	28

3.4.4	Concentração de Cálcio	29
3.4.5	Turbidez.....	30
3.4.6	Avaliação da Estabilidade Tartárica (K).....	31
3.4.7	Estabilização de Matéria Corante	31
3.5	Análise Sensorial	32
4	Resultados e Discussão.....	34
4.1	Teste de Variáveis	34
4.2	Testes de Estabilidade	35
4.3	Aplicação do Produto.....	36
4.4	Filtração	37
4.5	Análise Físico-Química	37
4.5.1	Método do Mini-contacto	41
4.6	Análise Sensorial	41
5	Conclusões	43
6	Avaliação do Trabalho Realizado	45
6.1	Objetivos Realizados	45
6.2	Outros Trabalhos Realizados.....	45
6.3	Propostas Futuras.....	45
6.4	Apreciação Final	45
7	Referências.....	47
	Apêndice A - Validação da Reta de Calibração de EAA à Chama.....	I
	Apêndice B - Folha de Prova Utilizada para Análise Sensorial	III

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Representação das diferentes regiões vinícolas de Portugal.</i>	3
<i>Retirado de Turiventos (2015)</i>	3
<i>Figura 2: Diferentes tipos de vinho do Porto de acordo com as caraterísticas do seu envelhecimento.</i>	5
<i>Retirado de Portugal (2021)</i>	5
<i>Figura 3: Cascos de madeira - Armazém Symington Family Estates, Vinhos S.A.</i>	6
<i>Figura 4: Balseiros de madeira - Armazém Symington Family Estates, Vinhos S.A.</i>	6
<i>Figura 5: Estrutura química do ácido acético.</i>	9
<i>Figura 6: Cristais formados em vinhos do Porto velhos depois de engarrafados.</i>	10
<i>Figura 7: Equilíbrio de dissociação do ácido tartárico em função do pH.</i>	11
<i>Adaptado de Triulzi et al. (2022)</i>	11
<i>Figura 8: Estrutura química do KHT.</i>	11
<i>Figura 9: Estrutura química do CaT.</i>	11
<i>Figura 10: Etapas do processo de cristalização em condições de sobressaturação. CP, produto de concentração; K_{PS}, produto de solubilidade. Adaptado de Vernhet (2019).</i>	13
<i>Figura 11: Representação esquemática do processo de ED. Adaptado de Ferreira and Bernardes (2011).</i>	17
<i>Figura 12: Esquema de filtração utilizado nos testes laboratoriais. (A) e (B) correspondem aos locais onde são colocados filtros com diâmetros de 47 e 25 mm, respetivamente.</i>	26
<i>Figura 13: Componentes básicos de um espectrofotómetro FTIR. Adaptado de Stuart (2004).</i>	29
<i>Figura 14: Representação esquemática do procedimento realizado no tratamento com CaT micronizado.</i>	33
<i>Figura 15: Resultados de estabilidade relativa a KHT, pelo método do mini-contacto, para a amostra (a) controlo e para as amostras tratadas com a dose (b) inferior, (c) recomendada e (d) superior de tratamento.</i>	41
<i>Figura 16: Resultados obtidos na prova sensorial das diferentes amostras em análise.</i>	42
<i>Figura A1: Reta de calibração para EAA à chama.</i>	I

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Estrutura química e principais caraterísticas dos ácidos L(+)-tartárico e L(-)-málico (Garcia & Barros, 2015; Ribéreau-Gayon et al., 2021; Zoecklein et al., 1995).</i>	8
<i>Tabela 2: Solubilidade KHT (g/L) em função da temperatura (°C) e do teor alcoólico (%), em soluções modelo. Adaptado de Boulton et al. (2013).</i>	12
<i>Tabela 3: Solubilidade do CaT (g/L) em função da temperatura (°C) e do teor alcoólico (%), em soluções modelo. Adaptado de Boulton et al. (2013)</i>	12
<i>Tabela 4: Tempo de proteção do vinho resultante da adição de AMT de acordo com a temperatura de armazenamento do mesmo. Adaptado de Carvalheira (2019).....</i>	17
<i>Tabela 5: Valores de referência para determinação do nível de estabilidade do vinho.</i>	22
<i>Tabela 6: Placas de celulose disponíveis da marca Fibrafix e respectivas porosidades.</i>	25
<i>Tabela 7: Informações relativas aos diferentes filtros utilizados no processo de filtração.</i>	26
<i>Todos os filtros são hidrofílicos e não-estéreis.....</i>	26
<i>Tabela 8: Tabela resumo dos diferentes processos de filtração testados, todos eles realizados à pressão 0,5 bar.</i>	26
<i>Tabela 9: Determinação do nível de estabilidade tartárica de vinhos do Porto tintos de acordo com M_c ($\mu S/cm$), verificada pelo método de mini-contacto. (Adaptado do procedimento interno da empresa Symington Family Estates, Vinhos S.A).</i>	31
<i>Tabela 10: Resultados de $\Delta[Ca]$ (mg/L) relativos a cada um dos ensaios de teste de variáveis - tempo de agitação e tempo de repouso.</i>	34
<i>Tabela 11: Tempo de agitação e repouso determinados para aplicação do produto nos restantes ensaios com CaT micronizado.</i>	34
<i>Tabela 12: Parâmetros físico-químicos relativos aos vinhos do Porto velhos em análise e respetivos resultados dos testes de estabilidade realizados. A classificação dada pode ser E - Estável, LI- Ligeiramente Instável e I- Instável e “Dose Rec.” corresponde à dose recomendada pelo laboratório produtor.</i>	35
<i>Tabela 13: Informações relativas à etapa de adição do produto: massa de produto (g) a adicionar correspondente a cada dose e respetivos volumes de dissolução inicial e final (mL), calculados para garrafas de 750 mL.....</i>	36
<i>Tabela 14: Resultados de turbidez (NTU) e concentração de Ca (mg/L) para as amostras submetidas a teste de filtração.</i>	37
<i>Tabela 15: $[Ca]$ em mg/L, determinada por EAA à chama, para as amostras controlo e para as amostras submetidas a tratamento com diferentes doses de produto.</i>	38

<i>Tabela 16: Resultados obtidos pelo teste estatístico de Mann-Whitney com grau de confiança de 95%.....</i>	<i>38</i>
<i>Adaptado de Graphpad Prism 9.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 17: Outros parâmetros avaliados às diferentes amostras de vinho - cor, turbidez (NTU), pH, AT (g/L ácido tartárico), [Ca] (mg/L), teor alcoólico (% V/V), MV (g/L) e [Ácido Tartárico] (g/L).</i>	<i>40</i>
<i>Tabela A1: [Ca] (mg/L) e respetivos valores de absorvância lidos a 422,7 nm.....</i>	<i>I</i>
<i>Tabela A2: Parâmetros t-Student calculados para um intervalo de confiança de 95%.....</i>	<i>II</i>
<i>Tabela A3: Parâmetros de validade da reta de calibração.</i>	<i>II</i>

Notação e Glossário

10A	Vinho <i>Tawny</i> 10 Anos
20A	Vinho <i>Tawny</i> 20 Anos
K _{PS}	Produto de Solubilidade
RSV	Vinho <i>Tawny</i> Reserva

Símbolos

c	Concentração	mol/L
M	Massa Molar	g/ mol
Mc	Redução Máxima de Condutividade	μS/cm
m	Massa	kg
t	Tempo	s
V	Volume	L

Símbolos Gregos

μ	Força Iónica	mol/L
Δ	Variação	
γ	Coeficiente de Atividade	

Índices

σ	Condições de Equilíbrio
i	Condições Iniciais
s	Condição de Saturação

Lista de Siglas e Acrónimos

AMT	Ácido Metatartárico
AT	Acidez Total
AV	Acidez Volátil
CMC	Carboximetilcelulose
DOC	Denominação de Origem Controlada
EAA	Espectrofotometria de Absorção Atómica
ED	Eletrodialise
FTIR	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i>
IV	Infra-Vermelho
IVDP	Instituto dos Vinhos do Douro e Porto
IVV	Instituto da Vinha e do Vinho
KPA	Poliaspartato de Potássio
LBV	<i>Late-Bottled Vintage</i>
MV	Massa Volúmica
NTU	<i>Nephelometric Turbidity Unit</i>
OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i>
PC	Produto de Concentração

UNESCO *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O presente trabalho foi realizado no âmbito da dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Química, no laboratório de controlo e qualidade de vinhos da empresa Symington Family Estates, Vinhos S.A. Focado na resolução de um problema de instabilidade tartárica em vinhos do Porto velhos, a nível de precipitação de tartarato de cálcio, o estudo desenvolveu-se de forma a testar a eficácia na remoção de cálcio em solução, por tratamento com um produto relativamente recente no mercado, o tartarato de cálcio micronizado, cujo nome comercial não pode ser revelado, por questões de confidencialidade. Foi realizada a avaliação de estabilidade segundo métodos propostos pelos fornecedores, teste das condições de aplicação que levariam à maior remoção de cálcio, avaliação do melhor método de filtração que levaria à remoção de todo o produto em suspensão e à adição do produto tendo em conta todas as condições determinadas, assim como as sugestões dadas em protocolo. Por medição da concentração de cálcio, antes e após os tratamentos, foi possível inferir sobre a eficácia do produto relativamente ao objetivo desejado.

1.2 Apresentação da Empresa

A *Symington Family Estates* é uma empresa portuguesa de vinhos, considerada, atualmente, a maior proprietária de vinhas no Vale do Douro e uma das principais produtoras de vinho português e vinho do Porto premium. Por possuir um total de 26 quintas no Vale do Douro que cobrem cerca de 2255 ha, e por ser proprietária de quatro das principais casas de vinho do Porto (*Graham's*, *Dow's*, *Warre's* e *Cockburn's*), a *Symington* é muitas vezes denominada como sendo um “império do vinho do Porto”. Dispõe ainda de um portefólio de vinhos DOC Douro composto por Quinta do Vesúvio, Quinta do Ataíde, Altano e *Prats & Symington* e, mais recentemente, os vinhos DOC Alentejo da Quinta da Fonte de Souto e da Quinta da Casa da Rodas da sub-região DOC Vinho Verde: Monção e Melgaço. As vinhas constituem a maioria dos terrenos explorados, existindo também, no entanto, plantações de oliveiras e árvores de citrinos, assim como uma grande área de matagal. A Quinta do Vesúvio, situada no Douro superior, representa a maior das vinhas com cerca de 133 ha de área e, de menor dimensão, com apenas 7 ha, encontra-se no vale do Rio Torto a menor da família, a Quinta da Madalena.

A empresa foi fundada por *Andrew James Symington* que chegou ao Porto vindo da Escócia em 1882 e ingressou na *Graham's*. Passados 9 anos, casou com *Beatrice Atkinson*, cuja família estaria já ligada à exportação e produção de vinho do Porto desde cerca de 1652 (SFE, 2023a). Tratando-se de uma empresa de propriedade e gestão familiar, conta atualmente com 10

membros da 4^a e 5^a geração da família diretamente envolvidos, que seguem os passos dos primórdios e aproveitam as conquistas das gerações anteriores, comprometendo-se a produzir os melhores vinhos do Porto (SFE, 2023b). De forma a responder às constantes exigências do mercado e a corresponder a todos os requisitos de qualidade alimentar, a *Symington* dispõe de laboratórios com equipas responsáveis por avaliar a qualidade dos vinhos e ainda explorar novos produtos e soluções para eventuais problemas.

1.3 Organização da Dissertação

A dissertação está dividida em 6 capítulos distintos: Introdução, Contexto e Estado de Arte, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões e Avaliação do Trabalho Realizado.

No Capítulo 1, Introdução é feita uma breve apresentação da problemática em estudo, enquadramento do projeto, e a apresentação da empresa Symington Family Estates, Vinhos S.A.

O Capítulo 2, Contexto e Estado de Arte, incide inicialmente na história e no papel do vinho em Portugal, no processo de produção, dos tipos e da composição química do vinho do Porto. É, também, dado a conhecer o problema de instabilidade tartárica, aprofundando no processo de cristalização do tartarato de cálcio, assim como diferentes procedimentos de avaliação e estabilização tartárica.

No Capítulo 3, Materiais e Métodos, são descritos os critérios de seleção dos vinhos de teste, assim como tratamentos prévios que tiveram de ser realizados. São, também, apresentados os métodos de estabilidade utilizados, e toda a metodologia de aplicação do produto, assim como estudos complementares, que levaram à determinação de variáveis não objetivas no protocolo fornecido e ainda o processo de filtração realizado. São expostos os procedimentos para análise físico-química e sensorial.

No Capítulo 4, Resultados e Discussão, apresentam-se os resultados obtidos para cada um dos testes realizados, nomeadamente, no teste de variáveis, estabilidade e filtração, da análise físico-química e sensorial e exploradas justificações para as conclusões retiradas.

No Capítulo 5, Conclusões, são apresentados, em resumo, os principais resultados obtidos que permitiram concluir acerca da eficiência do produto estudado.

No Capítulo 6, Avaliação do Trabalho Realizado, é feita uma análise global dos objetivos realizados, outros trabalhos paralelo, sugestões de trabalhos futuros e, ainda, uma apreciação final.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 O Vinho em Portugal

O vinho é uma bebida alcoólica produzida por fermentação de sumo de uvas que se pensa ter surgido há cerca de 7000 anos, no médio Oriente, tendo sido, na Europa, a Grécia a pioneira de plantação de uvas. Chega a Portugal por influência romana, povo para o qual teria um papel crucial e que estaria presente em quase todos os aspetos da sua vida quotidiana: transações comerciais, cerimónias fúnebres, banquetes e até na saúde, uma vez que era mais segura a sua ingestão do que a própria água disponível na cidade (Lodi-Ribeiro, 2017). Os vinhos portugueses são, então, resultado de uma sucessão de tradições introduzidas pelos romanos, assim como as restantes civilizações que ocuparam, em tempos, o território português, que possui, atualmente, cerca 190 mil ha de vinha (IVV, 2016).

As regiões vinícolas em Portugal dividem-se em 14, representadas na Figura 1, sendo elas: o Minho, Trás-os-Montes, Porto e Douro, Alentejo, Madeira e Açores, entre outras que, por diferirem tanto em termos de geografia, clima e solos, tornam os vinhos de Portugal tão diversificados e distintos dos restantes do mundo. Por esta razão, e pela vasta quantidade de castas nativas, Portugal é descrito pelo guia *The Oxford Companion to Wine* como um verdadeiro "tesouro de castas locais" (WineTeller, 2002), destacando-se a Touriga Nacional, Touriga Franca, Tinta Barroca, Tinto Cão, Tinta Roriz e Tinta Amarela (Moreira & de Pinho, 2011).

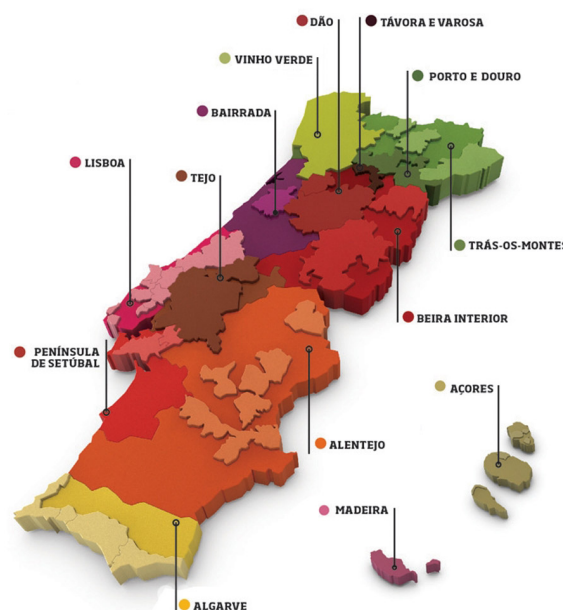


Figura 1: Representação das diferentes regiões vinícolas de Portugal.
Retirado de Turiventos (2015)

Portugal é, ainda, uma referência entre os principais países produtores e exportadores, tendo lugar no top 10 de produção e exportações a nível mundial, segundo o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV), representando 2,7% do total de exportações mundiais, em 2021 (IVV, 2021). Dos mercados compradores de vinhos portugueses, destacam-se a França, os Estados Unidos da América, o Reino Unido e o Brasil, que compram cerca de 44% do volume total de vinho nacional exportado.

O Douro, em particular, é uma região rica em microclimas onde se produzem vinhos de qualidade brancos, tintos e rosados, vinhos espumantes, licorosos e aguardentes (Olissipo, 2021). É a mais antiga região demarcada do mundo, datada a 10 de setembro de 1756 e conhecida principalmente pela qualidade do seu vinho do Porto, o “vinho generoso” na época de Marquês de Pombal. Nesta região, a maioria das plantações é feita em socalcos talhados nas encostas dos vales ao longo do rio Douro e os seus afluentes; com solos constituídos, essencialmente, por xisto e granito, característica que os torna particularmente difíceis de trabalhar, mas que garante benefícios significativos às vinhas e, consequentemente, aos vinhos aí produzidos: maior longevidade das vinhas e maior concentração em açúcar e cor nos vinhos. A paisagem característica das vinhas do Douro é reconhecida pela UNESCO como Património da Humanidade desde dezembro de 2001.

2.2 O vinho do Porto

O Vinho do Porto é um vinho licoroso produzido, há séculos, na região demarcada do Douro sob condições específicas, baseado em técnicas e métodos tradicionais melhorados ao longo dos tempos. O processo de produção inclui a interrupção da fermentação por adição de aguardente vínica e o envelhecimento em madeira ou na garrafa; o seu nome provém da cidade do Porto, ainda que seja maioritariamente produzido em Vila Nova de Gaia, cidade situada junto ao estuário do Rio Douro (Moreira & de Pinho, 2011). O vinho do Porto, assim como as condições de produção, está sujeito a legislações específicas e restritas dadas pelo IVDP (Instituto dos Vinhos do Douro e Porto) que garantem o controlo da qualidade deste produto.

2.2.1 Breve Descrição do Processo de Produção do Vinho do Porto

Uma vez colhidas e depois de chegadas à adega, as uvas passam por um processo de desengace e simultâneo esmagamento, onde são separados os bagos dos engaces (ou talos) e retirada alguma da polpa do interior da uva (Jackson, 2008). À mistura do sumo com as cascas e grainhas, resultante desta etapa, chama-se mosto, à qual é, de seguida, adicionado SO₂ de forma a controlar as contaminações microbianas e oxidações não desejadas, etapa denominada de sulfitação. Depois, recorrendo apenas às leveduras indígenas ou por inoculação das mais adequadas de acordo com o tipo de vinho a produzir, dá-se início a uma das etapas fulcrais: a fermentação alcoólica, que pode decorrer durante um período variado e que termina com a

adição de aguardente vínica com álcool a 77% - fortificação - distinguindo, assim, o processo de produção de vinho do Porto dos restantes tipos de vinho. De seguida, é realizada uma prensagem, com o intuito de retirar o máximo de matéria corante das películas das uvas (Grainger & Tattersall, 2008), da qual se obtêm duas correntes: uma sólida que contém as cascas e grainhas e que fica retida no interior da prensa; e outra líquida, agora denominada de vinho, que segue para o envelhecimento em madeira por períodos variados, dependentes, mais uma vez, do tipo de vinho do Porto desejado - fase denominada por estágio ou maturação (Grainger & Tattersall, 2008).

2.2.2 Diferentes Tipos de Vinho do Porto

Os vinhos do Porto inserem-se em duas grandes categorias: *Tawny* e *Ruby*, distinguidas pelo local de envelhecimento, que afeta, obviamente, as suas caraterísticas. O envelhecimento é iniciado em madeira de carvalho e depois, dependendo da categoria, o vinho é mantido em madeira ou transferido para garrafas. Na Figura 2, apresenta-se um esquema resumo dos diferentes vinhos do Porto, de acordo com as caraterísticas do seu envelhecimento.

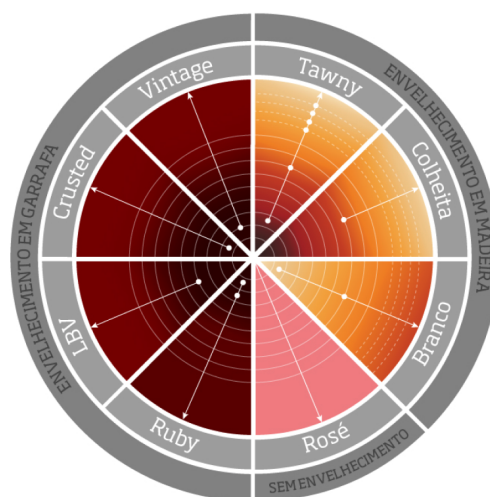


Figura 2: Diferentes tipos de vinho do Porto de acordo com as caraterísticas do seu envelhecimento.

Retirado de Portugal (2021)

Os vinhos *Tawny* são envelhecidos em cascos (550L) ou balseiros (10 a 100 mil L) de madeira, representados, respetivamente, nas Figuras 3 e 4, por ser pretendido o contacto com o oxigénio para um envelhecimento oxidativo; os vinhos da categoria *Ruby*, por sua vez, são caraterizados pelo envelhecimento redutor, na ausência de oxigénio, sendo, por isso, transferidos para a garrafa depois dos primeiros anos de maturação. Dentro de cada uma das categorias, dependendo principalmente do tempo de envelhecimento, existem diferenças processuais que distinguem os *Tawny* dos *Tawny Reserva*, *Tawny* com indicação da idade e dos *Colheita* e ainda os *Ruby* dos *Ruby Reserva*, *Crusted*, *Late-Bottled Vintage* (LBV) e dos *Vintage*. No âmbito deste trabalho, importa clarificar o conceito de *Tawny* com indicação de idade e *Tawny Reserva*, uma vez que serão utilizados para os ensaios vinhos *Tawny* de 10 e 20 anos e um vinho *Tawny*

Reserva, ainda que possam, no entanto, ser utilizados vinhos com outras denominações. Ora, *Tawnys* com indicação de idade são então produzidos por uma mistura de lotes (*blending*) com diferentes caraterísticas e anos de maturação, cuja média de idades deve ser igual à denominação dada, ou seja, aos 10 ou 20 anos referidos em rótulo. *Tawny* Reserva corresponde, também, a um vinho obtido por lotação de vinhos com diferentes idades de envelhecimento, mas que têm obrigatoriamente um mínimo de 6 anos em madeira (IVDP, 2023). A gama *premium* dos vinhos *Tawny* são os Colheita, que provêm de anos específicos de boas colheitas e que estão, normalmente, associados a longos anos de envelhecimento em madeira (Moreira & de Pinho, 2011).



Figura 3: Cascos de madeira - Armazém Symington Family Estates, Vinhos S.A.



Figura 4: Balseiros de madeira - Armazém Symington Family Estates, Vinhos S.A.

2.2.3 Composição do Vinho do Porto

As caraterísticas e qualidade dos vinhos medem-se de acordo com a sua composição que depende, obviamente, da constituição das uvas que lhes deram origem. As uvas são compostas por água, açúcares, ácidos, fenóis, compostos aromáticos, metais, etc., aos quais se acrescentam compostos produzidos durante a fermentação, como álcoois e ésteres, e ainda aqueles que se obtêm por reações químicas durante todo o processo, pelo contacto com materiais como a madeira e as rolhas de cortiça (Garcia & Barros, 2015). Por esta razão, o vinho apresenta uma matriz muito complexa, onde todos os seus constituintes têm alguma contribuição para as suas caraterísticas e qualidade.

2.2.3.1 Composição Mineral

A composição mineral do vinho contribui de forma substancial para as suas caraterísticas sensoriais, tem influência na cor, aspeto e aroma e reflete a sua origem e percurso, uma vez que depende das caraterísticas dos solos e das castas que lhes deram origem, assim como das condições de viticultura e práticas enológicas associadas à sua produção. Dos elementos

minerais presentes no vinho, destacam-se alguns metais como o potássio (K), cálcio (Ca), sódio (Na) e magnésio (Mg), principais responsáveis pela “estrutura metálica”, que podem representar, no total, cerca de 1,5 a 3 g/L e provêm, na maioria, da absorção radicular por parte da videira (Garcia & Barros, 2015). Por estarem relacionados com fenómenos de instabilidade físico-química, a análise destes metais é, há muito tempo, objeto de especial atenção na área da química enológica. Em concentrações muito inferiores, geralmente entre 0,1 e 10 mg/L, podem também ser encontrados outros metais como alumínio (Al), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn), entre outros, que são indispensáveis à vida dos seres vivos em quantidades muito reduzidas; e ainda outros elementos vestigiais e subvestigiais que podem também estar presentes, ainda que, normalmente, em concentrações inferiores a 100 µg/L e 1 µg/L, respetivamente. Estes elementos provêm também, em grande parte, da absorção radicular (Garcia & Barros, 2015) que, a favor do gradiente de concentração, entram nas células da raiz e são absorvidos até chegarem às restantes partes da planta.

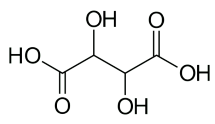
Tendo em conta que o K e o Ca se encontram entre os principais constituintes minerais dos vinhos, e por serem o grande foco deste estudo, torna-se importante incidir e aprofundar no estudo das suas caraterísticas. O K é um elemento químico da família dos metais alcalinos de número atómico 19 e massa molar 39 g/mol. Trata-se de um dos poucos minerais translocados pela seiva através do floema e é o catião presente em maior quantidade nos mostos, representando cerca de 50% da matéria mineral no vinho (concentrações entre 500 e 2000 mg/L). Na videira, está presente essencialmente nos vacúolos das células e, também em quantidades significativas, nas células das películas da uva (Santos et al., 2017). O Ca é um elemento químico da família dos metais alcalino-terrosos com número atómico 20 e massa molar de 40 g/mol, que aparece nas uvas principalmente por absorção radicular, o que atribui uma enorme importância aos tratamentos realizados à terra e à vinha e localiza-se, maioritariamente, na polpa e na película da uva, podendo atingir, no vinho, concentrações de 30 a 150 mg/L (Curvelo-Garcia, 1988). O Ca desempenha um papel essencial no desenvolvimento de todas as plantas, uma vez que apresenta funções de mensageiro em situações de *stress* e é um dos constituintes das paredes e membranas celulares. Ao contrário do K, o Ca move-se, essencialmente, através dos vasos do xilema, dependendo da atividade de evapotranspiração da planta, ainda que cerca de 75-90% do cálcio existente, se encontre no bago antes do pintor - início da fase de maturação das uvas. A quantidade de cálcio absorvida pela videira depende das caraterísticas do solo, nomeadamente da composição e pH, sendo que a presença de nitratos nos solos promove a absorção de cálcio, enquanto que, pelo contrário, a existência de K^+ e Mg^{2+} a diminuem; solos mais alcalinos tendem, também, a apresentar maior acumulação deste metal. Além disso, o uso de produtos de clarificação e estabilização de matéria corante contendo Ca e, ainda que cada vez mais em desuso, o armazenamento do vinho

em tanques de betão (AWRI, 2023), são fatores que contribuem também para o aumento do seu teor em cálcio.

2.2.3.2 Composição Ácida

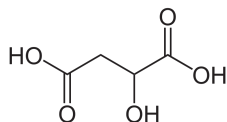
Os ácidos presentes no vinho têm diferentes origens: alguns são provenientes das uvas; outros da atividade de microrganismos (bactérias e leveduras); de processos químicos naturais verificados durante a evolução dos mostos e dos vinhos, e ainda de outros processos tecnológicos como, por exemplo, a adição de corretivos ácidos. Os ácidos orgânicos fixos (não voláteis) conferem, quase na totalidade, as propriedades ácidas aos vinhos, tendo, por isso, um papel fundamental nos equilíbrios ácido-base, na estabilidade microbiológica e nas caraterísticas organoléticas relacionadas com “gosto ácido”, destacando-se, entre eles, pela relevância e abundância, o ácido L(+)-tartárico, seguido do ácido L(-)-málico e, com menos importância, o ácido cítrico (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2021), succínico, L(+)-lático e D(+)-lático (Garcia & Barros, 2015). A estrutura química dos dois principais ácidos, assim como algumas caraterísticas e informações relacionadas, encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Estrutura química e principais caraterísticas dos ácidos L(+)-tartárico e L(-)-málico (Garcia & Barros, 2015; Ribéreau-Gayon et al., 2021; Zoecklein et al., 1995).

Ácido L(+)-tartárico 	• Ácido mais importante dos vinhos, presente em concentrações de cerca de 1500 a 4000 mg/L ainda que possam diferir ligeiramente segundo alguns autores e de acordo com a região, variedade, maturação, solo e das práticas de viticultura; • Responsável pelo “gosto ácido puro”; • Comummente designado por “<i>wine acid</i>” por ser específico das uvas; • Determinante dos valores de acidez total e pH do vinho, com $pK_{a1}=3,12^*$ e $pK_{a2}=4,19^*$; • Muito resistente a ações bacterianas; • Diminuição da concentração ao longo da maturação por fenómenos de combustão e diluição e durante a fermentação alcoólica por precipitação dos sais de potássio e cálcio.
---	--

(Continua)

Ácido L(-)-málico



- Presente em todos os organismos vivos;
- Existente nas uvas e nos vinhos em concentrações que podem atingir os 4000 mg/L;
- “Gosto ácido puro e verde”;
- $pK_a=4,53^*$;
- Apresenta uma diminuição acentuada durante o processo de maturação das uvas, pelo que é importante para a caraterização do estado de maturação e da qualidade da vindima, e ainda durante a fermentação alcoólica e malolática, o que faz com que o seu valor final não apresente significado analítico.

*Valores de pK_a medidos a 25°C e a 10%(V/V) álcool

O ácido acético, cuja estrutura se encontra representada na Figura 5, pertence a outra categoria de ácidos orgânicos, os ácidos voláteis, e representa cerca de 90% deste grupo, nos vinhos; tem uma elevada importância no valor da acidez volátil e é produzido durante a fermentação, sendo que as quantidades alcançadas dependem das condições desta etapa, assim como da composição do mosto e estirpes de leveduras utilizadas e ainda das caraterísticas de armazenamento (Curvelo-Garcia, 1988). Trata-se de um ácido fraco, com $pK_a=4,73$ em solução aquosa, e é associado a um “gosto ácido” desagradável e acre. Além deste, outros ácidos pertencentes ao grupo dos voláteis têm sido identificados nos vinhos, como é o caso do ácido fórmico, propiónico, butírico, entre outros, que se pensa estarem associados à oxidação de álcoois e aldeídos por parte das leveduras e que conferem caraterísticas organoléticas negativas aos vinhos, nomeadamente no seu aroma (Garcia & Barros, 2015).

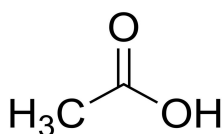


Figura 5: Estrutura química do ácido acético.

2.3 Instabilidade Tartárica

Um dos principais problemas de instabilidade, principalmente em vinhos velhos engarrafados, está relacionado com o aparecimento de cristais de bitartarato de potássio (KHT) e, ainda que em menor quantidade, tartarato de cálcio (CaT), Figura 6, compostos naturais das uvas (Gonçalves et al., 2003).



Figura 6: Cristais formados em vinhos do Porto velhos depois de engarrafados.

A existência destes cristais não representa qualquer perigo para a saúde humana, no entanto, é vista como uma falha à qualidade dos vinhos podendo, por isso, levar à sua desvalorização pela alteração da perceção por parte do consumidor (Cabrita et al., 2016). Para combater este problema são realizadas práticas enológicas, com o intuito de estabilizar estes iões em solução, impedindo que, a longo prazo, precipitem e formem cristais de tartaratos. Relativamente ao potássio, e ao contrário do que acontece com o cálcio, são já conhecidos e postos em prática alguns métodos de estabilização, uma vez que este se trata de um problema mais recorrente, por este metal se encontrar em quantidades muito superiores nos vinhos. A formação de cristais de CaT é um acontecimento mais imprevisível quando comparada com o KHT, o que dificulta a análise da sua tendência à formação de cristais que, por ser mais lenta, se associa a vinhos mais velhos e com alguns anos em garrafeira. No geral, é um fenómeno que ocorre maioritariamente em vinhos licorosos, com maior teor em açúcar e álcool, pelo que os vinhos do Porto são dos principais afetados (Zoecklein et al., 1995). Por representarem apenas um nicho do mercado e embora seja um tema de interesse na área de controlo de qualidade, poucas são as práticas de estabilização disponíveis, no entanto, alguns laboratórios têm vindo a trabalhar no desenvolvimento de procedimentos que buscam resolver esta problemática.

2.3.1 Precipitações Tartáricas

O ácido tartárico (H_2T) é um ácido forte que, em solução, se dissocia e dá origem aos iões bitartarato (HT^-) e tartarato (T^{2-}), segundo as Equações 1 e 2. A proporção destes compostos é dependente do pH, da temperatura, do teor em álcool e das forças iónicas presentes no vinho (Coulter et al., 2015).



Na Figura 7, pode verificar-se que em soluções com pH compreendido entre 3 e 4, gama onde se inserem os vinhos utilizados neste estudo, existe uma maior disponibilidade de iões bitartarato, quando comparado com as duas outras formas. O HT^- e o T^{2-} podem associar-se a

outros iões presentes no meio, como o K^+ e o Ca^{2+} , levando à formação de tartaratos: o bitartarato de potássio (também designado por hidrogenotartarato de potássio, KHT) e tartarato de cálcio, CaT (Ribéreau-Gayon et al., 2021) que, por apresentarem solubilidades reduzidas, estão diretamente ligados à instabilidade tartárica nos vinhos (Lasanta & Gómez, 2012).

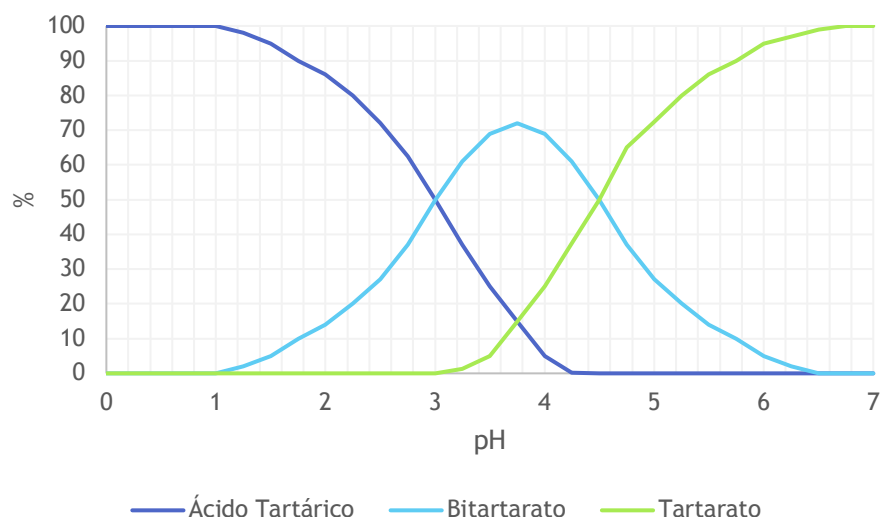


Figura 7: Equilíbrio de dissociação do ácido tartárico em função do pH.

Adaptado de Triulzi et al. (2022)

Além destes, podem formar-se outros sais como o tartarato de potássio, o tartarato duplo de potássio e cálcio e o tatromalato de cálcio, ainda que menos frequentes. Estes dois últimos apresentam a capacidade de permanecer estáveis a pHs superiores a 4,5 e, ao contrário do tatromalato de cálcio que cristaliza facilmente e em forma de agulhas, o tartarato duplo de potássio e cálcio possui uma solubilidade elevada sendo de mais difícil precipitação (Ribéreau-Gayon et al., 2021). A estrutura do KHT e CaT, já mencionados, estão representadas nas Figuras 8 e 9.

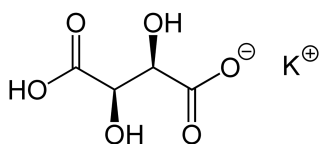


Figura 8: Estrutura química do KHT.

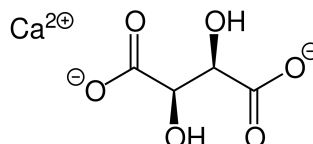


Figura 9: Estrutura química do CaT.

A solubilidade destes sais depende, obviamente, das características do solvente onde são dissolvidos, nomeadamente do pH, teor alcoólico e temperatura (Boulton et al., 2013; Curvelo-Garcia, 1987). O KHT apresenta uma solubilidade de 5,7 g/L em água a 20 °C (Andrade, 2012), no entanto, numa solução hidroalcoólica a 10 %(V/V), este valor desce para apenas 2,9 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2021), tornando-se totalmente insolúvel a 95 %(V/V) (Ecofiltra, 2015). De forma a aproximar as características do solvente às do vinho, permitindo a obtenção de

valores mais próximos de solubilidade para esse meio, alguns autores determinaram a concentração máxima possível de dissolver de KHT, em soluções modelo, e obtiveram os resultados apresentados na Tabela 2, dependentes do teor alcoólico e da temperatura. Na gama de trabalho, vinhos com cerca de 20 % (V/V) de álcool, e à temperatura de armazenamento de cerca de 15 °C, a solubilidade deste sal deverá ser próxima de 1,51 g/L. A concentração de KHT no vinho é, normalmente, superior a este valor, o que faz com que ocorra, naturalmente, precipitação (Ribéreau-Gayon et al., 2021)).

Tabela 2: Solubilidade KHT (g/L) em função da temperatura (°C) e do teor alcoólico (%), em soluções modelo. Adaptado de Boulton et al. (2013).

Temperatura (°C)	Teor Alcoólico (%V/V)	
	0	20
0	2,25	0,68
10	3,42	1,10
15	4,17	1,51
20	4,92	1,82

O CaT, por sua vez, apresenta uma solubilidade inferior, 0,53 g/L em água a 20 °C (Andrade, 2012), também com tendência a diminuir com o aumento do teor alcoólico da solução (Boulton et al., 2013). Na Tabela 3 são apresentados os valores obtidos para soluções modelo, para diferentes temperaturas e percentagens de álcool, correspondendo 0,45 g/L à solubilidade do CaT numa solução com 20 % (V/V) de álcool, à temperatura de 15 °C.

Apesar de uma solubilidade inferior, quando comparado com a do KHT, o facto da concentração de CaT em solução nos vinhos ser muito inferior, faz com que a sua precipitação seja menos comum.

Tabela 3: Solubilidade do CaT (g/L) em função da temperatura (°C) e do teor alcoólico (%), em soluções modelo. Adaptado de Boulton et al. (2013)

Temperatura (°C)	Teor Alcoólico (%V/V)	
	0	20
0	1,56	0,27
10	2,13	0,38
15	2,48	0,45
20	2,90	0,53

Apesar dos valores de solubilidades obtidos para soluções modelo com a mesma concentração em etanol e força iónica, os vinhos mostram conseguir dissolver uma maior quantidade de sais do que a determinada (Boulton et al., 2013), o que indica a existência de outros compostos que afetam o equilíbrio e/ou inibem o crescimento dos cristais (Lasanta & Gómez, 2012) e dificultam a avaliação das condições de sobressaturação.

2.3.2 Processo de Cristalização

A cristalização é um processo em que, por se criarem condições termodinâmicas favoráveis, as moléculas se aproximam e agrupam-se sob a forma de estruturas altamente organizadas, os cristais. Este processo ocorre quando, numa solução, o produto de concentração (PC) excede o produto de solubilidade (K_{PS}) (Berg & Keefer, 1958) ou, por outras palavras, a concentração do sal na solução excede a solubilidade. Quando, pelo contrário, PC é inferior ao K_{PS} , a solução encontra-se subsaturada e não ocorre a precipitação dos sais dissolvidos.

O processo é dividido em duas etapas (Dunsford & Boulton, 1981): nucleação e crescimento (Vernhet, 2019), representadas no gráfico da Figura 10.

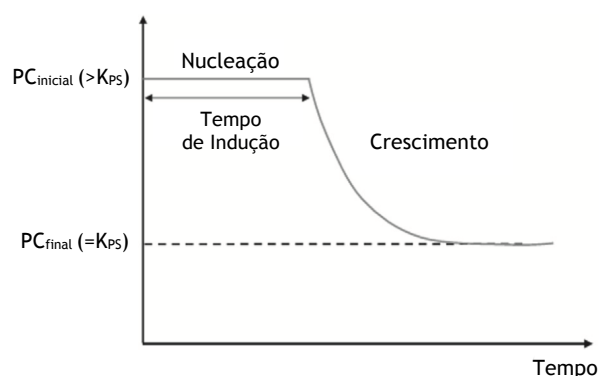


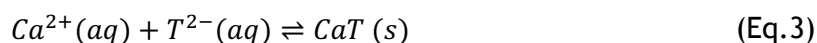
Figura 10: Etapas do processo de cristalização em condições de sobressaturação. CP, produto de concentração; K_{PS} , produto de solubilidade. Adaptado de Vernhet (2019).

Numa solução sobressaturada - estado muito instável (Ribéreau-Gayon et al., 2021) - dá-se a formação de pequenos núcleos de cristalização a partir dos quais ocorrerá o crescimento dos cristais. A formação dos pequenos cristais numa solução líquida corresponde à criação de uma interface entre as duas fases, daí ser um processo que requiere muita energia, e que corresponde à etapa limitante do processo de cristalização. Esta fase pode ser espontânea (nucleação primária), originando cristais de grandes dimensões devido ao seu crescimento lento; ou secundária, no caso da formação dos núcleos ser induzida pela presença de pequenas partículas de natureza idêntica ou distinta à do sal a cristalizar (Mira et al., 2004), acelerando esta etapa e levando à formação de mais cristais e de menores dimensões (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2021). Assim, dá-se início à fase seguinte, em que os núcleos estáveis se ligam a iões disponíveis no meio e crescem (Boulton, 1982). A velocidade de crescimento dos cristais, depois de formados, é controlada pelo transporte dos iões por difusão e/ou convecção da solução para a superfície do cristal e pela sua ligação ao cristal propriamente dito (Vernhet, 2019). O crescimento continua até ao ponto em que o PC iguala o K_{PS} e é, ainda, dependente da temperatura, do tempo e das condições de agitação e do grau de sobressaturação do vinho ($\Delta c = c - c_s$), sendo c a concentração do sal na solução e c_s a solubilidade ou concentração de saturação, (Abguéguen & Boulton, 1993; Gerbaud et al., 2010;

McKinnon et al., 1994). Alguns parâmetros influentes serão, também, abordados especificamente para cada um dos sais e o processo de cristalização será descrito de forma mais exaustiva para o tartarato de cálcio, uma vez que apresenta maior relevância para o estudo. Ainda assim, será também explorado para o KHT, uma vez que estão interligados e que apresentam algumas semelhanças de metodologias de estabilização.

2.3.2.1 Cristalização do Tartarato de Cálcio

O Ca^{2+} em solução nos vinhos, reage com o tartarato, de acordo com a Equação 3 e o K_{PS} , dependente das concentrações de cada um dos iões resultantes da dissociação do CaT, é definido pela expressão da Equação 4, correspondendo o índice σ às condições de equilíbrio, (Abguéguen & Boulton, 1993; Lasanta & Gómez, 2012) podendo ser, também, apresentado na sua forma mais elaborada, dependente dos coeficientes de atividade de cada ião ($\gamma_{\text{Ca}^{2+}}$ e $\gamma_{\text{T}^{2-}}$) além das respetivas concentrações. O PC é dado pela Equação 5.



$$K_{PS_{\text{CaT}}} = [\text{T}^{2-}]_{\sigma} [\text{Ca}^{2+}]_{\sigma} \quad (\text{Eq.4})$$

$$PC_{\text{CaT}} = [\text{T}^{2-}][\text{Ca}^{2+}] \quad (\text{Eq.5})$$

A cinética de cristalização do CaT, estudada em soluções modelo e em vinhos, ocorre segundo uma reação de segunda ordem (Abguéguen & Boulton, 1993) e, embora deva ser maior do que a do KHT, o tempo necessário para que se dê a nucleação espontânea é muito superior, pelo que a sua precipitação é mais tardia (Ribéreau-Gayon et al., 2006), ocorrendo normalmente em vinhos velhos, já depois de engarrafados. O CaT precipita na forma de cristais brancos ou transparentes com forma bipiramidal ou romboide, muito distintos dos de KHT e que são, por isso, facilmente identificados ao microscópio, no entanto, a forma mais exata de saber se se tratam, efetivamente, de cristais de CaT, será recorrendo a Espetroscopia IV (AWRI, 2023).

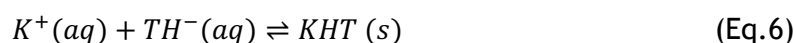
Fatores que Afetam a Cristalização do CaT

Ao contrário do que acontece com o KHT, em que a temperatura afeta de forma significativa o valor de solubilidade, o CaT fica apenas três vezes mais solúvel à temperatura de -4°C (Ribéreau-Gayon et al., 2006), pelo que se torna difícil forçar a sua precipitação recorrendo às baixas temperaturas; o pH, por sua vez, desempenha um papel fundamental na formação deste sal, uma vez que regula o equilíbrio da dissociação do ácido tartárico (Triulzi et al., 2022), sendo a quantidade de iões tartarato disponíveis para formação do CaT maior quanto menos ácida for a solução: vinhos com valores de pH mais elevados tendem a favorecer a precipitação de CaT (McKinnon et al., 1994). O teor alcoólico afeta de igual forma a solubilidade, sendo que esta será tanto menor quanto mais elevada for a concentração de etanol da solução (Abguéguen & Boulton, 1993); e ainda, obviamente, a concentração de cálcio no vinho, que representa,

também, um dos principais fatores influentes: quanto maior a concentração de cálcio, maior a proximidade do ponto de saturação e, conseqüentemente, maior a tendência à cristalização. A agitação diminui, também, o tempo necessário à precipitação e, por fim, a presença de compostos como ácido glucónico, málico (Clark et al., 1988) e cítrico (Mckinnon et al., 1995), colóides, potássio ou magnésio, apresentam efeito inibidor à precipitação. Os baixos teores em cálcio nos vinhos aliados a uma elevada energia exigida para formação dos núcleos de cristalização, tornam a precipitação do CaT muito lenta e o seu comportamento muito imprevisível.

2.3.2.2 Cristalização do Bitartarato de Potássio

Por se tratar do sal mais abundante no vinho (Escudier et al., 1998), o KHT está associado a sobressaturação e conseqüente instabilidade nos vinhos, às temperaturas reduzidas a que esses são, normalmente, armazenados (Nunes, 2011; Ribéreau-Gayon et al., 2006). A cristalização deste sal ocorre segundo a Equação 6, e trata-se de um acontecimento imprevisível por possuir uma zona de meta-estabilidade alargada (Lasanta & Gómez, 2012), que torna difícil a sua passagem ao estado de cristal (Maujean et al., 1985).



Fatores que Afetam a Cristalização do KHT

A cristalização do KHT é influenciada por vários fatores externos, que podem impedir ou favorecer a sua ocorrência, nomeadamente: a temperatura, o pH, a concentração de bitartarato e ainda a presença de substâncias coloidais (Santos et al., 2000) como proteínas, taninos, pigmentos ou pectinas, que impedem a formação dos cristais (Ribéreau-Gayon et al., 2021). A presença destes colóides (Jackson, 2008) ou ainda de metais, como o magnésio e o cálcio (Zoecklein, 1988), podem levar à formação de complexos com o ácido tartárico e/ ou com os iões de K^+ livres, impedindo a precipitação do KHT. A temperatura atua de forma proporcional com a solubilidade deste sal, pelo que se nota que as baixas temperaturas tendem a favorecer de forma muito significativa o fenómeno de cristalização, por diminuírem a sua solubilidade; o aumento do teor alcoólico de uma solução diminui, de igual forma, a solubilidade do KHT, provocando a sua cristalização, tal como já referido anteriormente.

2.4 Estabilização Tartárica

Existem já alguns métodos que, por forçarem ou inibirem a cristalização destes sais, se mostram eficazes na estabilização e alguns deles são, atualmente, utilizados como prática enológica. Algumas das estratégias possíveis implicam a diminuição da solubilidade dos sais tartáricos presentes no vinho, através do método de estabilização a frio, a eletrodialise (ED) ou permuta iónica, onde são removidos os catiões necessários para que ocorra a precipitação dos tartaratos (Gonçalves et al., 2003), ou ainda a adição de inibidores de cristalização, que

estabilizam os sais dissolvidos, atrasando a sua precipitação, por exemplo o ácido metatartárico (AMT) (Cabrita et al., 2016), o poliaspartato de potássio (KPA) (Natolino et al., 2023) ou a Carboximetilcelulose (CMC) (Cabrita et al., 2016; Moutounet et al., 2010).

A estabilização a frio não apresenta eficácia relativa ao CaT uma vez que, como já referido, a temperatura não tem grande impacto na solubilidade deste sal (Triulzi et al., 2022) sendo, no entanto, muito eficaz na estabilização de KHT. Consiste na redução da temperatura a uma temperatura próxima da de congelação (Lasanta & Gómez, 2012), dependente do teor alcoólico do vinho em análise, durante um período de alguns dias (normalmente 1 semana (Lasanta & Gómez, 2012)), de forma a induzir a cristalização e, consequentemente, reduzir a concentração do sal na solução (Cabrita et al., 2016). Para acelerar este tratamento, podem ainda ser adicionados cristais de KHT que, além de sobressaturarem a solução, criam núcleos de cristalização e facilitam o processo, ultrapassando a etapa limitante da precipitação (Gonçalves et al., 2003). Este método não permite, no entanto, um controlo preciso da concentração final de KHT no vinho e não se adequa à estabilização do CaT (Maujean et al., 1985), pelo que não é a opção mais indicada para o fim desejado. Além disso, estão também associadas grandes perdas de vinho que é descartado juntamente com o precipitado depois de filtrado, gastos elevados de tempo e consumo de energia na refrigeração e ainda perda de cor, pela precipitação de polifenóis (Gonçalves et al., 2003; McKinnon et al., 1994) que conferem essa característica aos vinhos (Benítez et al., 2003a; Cabrita et al., 2016).

A ED, outra das opções referidas, trata-se de um método baseado na migração elétrica de iões de acordo com a sua carga, em que se faz passar o vinho por canais delimitados por membranas seletivas para aniões ou catiões e, através de um campo elétrico externo, os iões presentes no vinho são forçados a migrar em direção ao eletrodo de carga oposta, dando origem a uma corrente de vinho isenta de iões (Strathmann, 1986), Figura 11. Embora seja visto, por alguns autores, como um método eficaz (em vinhos tranquilos) e que não prejudica as características organoléticas do vinho (Cabrita et al., 2016; Gonçalves et al., 2003), como é o caso da cor, aroma e sabor; outros associam ao processo uma redução significativa na concentração de ácido tartárico que reduz, substancialmente, o potencial de envelhecimento do vinho (Enartis, 2022). Além disso, em testes realizados internamente, verificou-se que, além da desvantagem relativa aos custos acrescidos ao processo (Andrade, 2012; Lasanta & Gómez, 2012), o método prejudica muitas das características da matriz, principalmente quando aplicado em vinho do Porto.

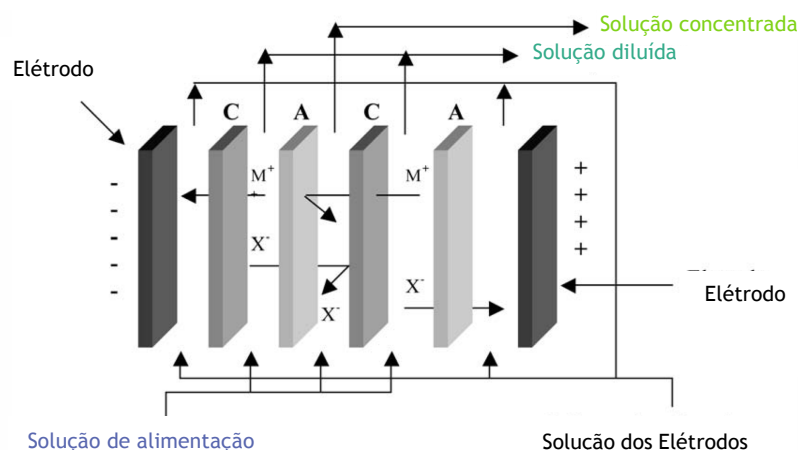


Figura 11: Representação esquemática do processo de ED. Adaptado de Ferreira and Bernardes (2011).

A permuta iónica utiliza resinas catiónicas para remoção dos iões de potássio ou cálcio, substituindo-os por iões H^+ e Na^+ (Gonçalves et al., 2003), no entanto, apesar de se tratar de um método relativamente eficiente, retira muitas propriedades ao vinho e tem um grande impacto sensorial no mesmo, uma vez que tem uma forte influência no pH (Enartis, 2022), pelo aumento da concentração de H^+ .

As técnicas “aditivas” que utilizam coloides protetores ou outros inibidores de cristalização para tratamento do vinho, respeitam mais a sua qualidade sensorial e são, por isso, de elevado interesse nesta problemática (Enartis, 2022), principalmente associado à estabilização do KHT, uma vez que se mostram insuficientes na inibição da cristalização de CaT (Enartis, 2022). O AMT é uma das possibilidades que, a curto prazo, apresenta elevada eficiência no impedimento da formação de cristais de KHT, mas que, por ser um produto suscetível a hidrólise, revela uma rápida perda de eficácia (Triulzi et al., 2022; Zoecklein et al., 1995), dependente da temperatura de armazenamento do vinho (Tabela 4), tratando-se de uma prática sem interesse para aplicação em vinhos cujo consumo poderá não ser imediato ou próximo do seu engarrafamento, como é o caso do vinho do Porto.

Tabela 4: Tempo de proteção do vinho resultante da adição de AMT de acordo com a temperatura de armazenamento do mesmo. Adaptado de Carvalheira (2019).

Temperatura (°C)	Tempo de Proteção
0	Alguns anos
10-12	2 anos
12-18	1 ano - 1 ano e meio
>20°	3 meses

A CMC é mais estável quando comparada com o AMT e é muito eficaz na inibição da precipitação tartárica. Na presença deste composto, que compete contra os iões de bitartarato na ligação ao cristal de KHT (Crachereau et al., 2001), os cristais crescem mais lentamente e sofrem alterações morfológicas (Gerbaud, 1996). Por interagir, também, com proteínas é necessário que seja garantida a estabilidade proteica antes do tratamento e, outra das grandes

limitações associadas, é o facto deste produto não ser aconselhável no tratamento de vinhos tintos, uma vez que pode provocar a precipitação da matéria corante (Cabrita et al., 2016). O KPA representa outra alternativa e a sua adição, em específico, tem uma maior importância para o presente estudo, uma vez que será o método utilizado para, numa fase final, proceder à estabilização tartárica a nível de KHT. Este tratamento não depende, a longo prazo, das condições de armazenamento do vinho, sendo, no entanto, necessária a prévia estabilização proteica (Carvalheira, 2019); só pode ser administrado até 300 mg/L, segundo o regulamento UE 1399/2017 (Europeia, 2017), o correspondente a 100 mL/hL da solução utilizada, cuja marca não será revelada.

Todas estas técnicas apresentam maior relevância no que toca à estabilização do K, pelo que, na tentativa de arranjar alternativas mais eficientes de estabilização do Ca nos vinhos foi desenvolvido um produto estabilizante à base de CaT micronizado. Segundo os produtores, que não serão revelados, por uma questão de confidencialidade, o produto apresenta uma elevada pureza química e neutralidade sensorial, e, devido às dimensões das suas partículas (inferiores a 1 μm), que atuam como pequenos núcleos de cristalização, a formação dos cristais é acelerada, tornando-se um processo mais previsível e controlado. Depois de formados os cristais, o vinho é filtrado de forma a remover o excesso de CaT em suspensão.

2.4.1 Avaliação da Estabilidade Tartárica nos Vinhos

Relativamente à avaliação da estabilidade de Ca nos vinhos, ainda são poucos os métodos em prática: um dos métodos tradicionais envolve a comparação do K_{PS} com o PC de forma a avaliar a sobressaturação da solução, no entanto, das duas uma: o K_{PS} é calculado sem serem considerados os coeficientes de atividade e o método será pouco preciso, pois a comparação não será totalmente realista (Mckinnon et al., 1995); ou são calculados os coeficientes recorrendo a modelos matemáticos, tornando o método trabalhoso, dispendioso e pouco prático.

Algumas referências consideram um vinho mais ou menos estável baseando-se apenas no seu teor em cálcio, considerando que vinhos brancos com concentrações superiores a 60 mg/L e vinhos tintos com mais de 80 mg/L têm uma elevada tendência para a formação de precipitados. Estes valores foram obtidos em estudos muito antigos, quando os valores de pH dos vinhos eram, nitidamente, diferentes aos atuais (Ribéreau-Gayon et al., 2004), pelo que não podem ser aplicados para retirar conclusões, muito menos para vinhos do Porto (vinhos para as quais não foram encontrados valores), uma vez que, tal como já referido, se tratam de vinhos com características muito distintas dos restantes. Esta informação apenas pode ser tomada para comparações e não como critério de estabilidade.

Outro método possível, é baseado na determinação da temperatura de saturação do vinho, calculada através da variação de condutividade em que, de acordo com uma gama de

temperaturas tabeladas, o vinho é considerado mais ou menos estável. No entanto, este método foi desenvolvido para vinhos tranquilos, com matrizes e comportamentos muito distintos do Vinho do Porto, pelo que as mesmas gamas de estabilidade não devem, nem foram utilizadas.

Neste trabalho, foram utilizadas duas formas distintas de avaliação, que serão abordadas posteriormente e que foram criadas e sugeridas pelo laboratório produtor do CaT micronizado, produto em teste.

O grau de estabilidade do vinho, em relação ao K, pode ser avaliado através do método do frio e de mini-contacto (Cabrita et al., 2016; Lasanta & Gómez, 2012; Ribéreau-Gayon et al., 2021; Zoecklein et al., 1995):

O teste do frio é um método muito simples e com interesse apenas na classificação de estabilidade do KHT, uma vez que, ao contrário do CaT, a sua cristalização é, significativamente, afetada pela temperatura (Cabrita et al., 2016). Uma amostra de vinho é submetida a uma temperatura negativa e deixada durante um período definido, ao fim do qual é observada, contraluz, e avaliada a existência de cristais. Este teste é normalmente realizado a uma temperatura de -2°C durante um período de 2 semanas ou durante 6 dias à temperatura de -4°C (Vernhet, 2019).

O método do mini-contacto mede a diminuição da condutividade do vinho mantido a uma temperatura reduzida com a adição de KHT, que induz a precipitação do sal. Por representação gráfica da condutividade ao longo do tempo, é possível realizar uma extrapolação do valor máximo de precipitação, equivalente a um tempo infinito, e redução máxima de condutividade (Mc) (Lasanta & Gómez, 2012). De acordo com o valor obtido e recorrendo a intervalos tabelados, é possível inserir o vinho numa determinada gama de valores, indicativa da sua estabilidade relativamente ao ião K^+ . Alguns autores referem uma temperatura de trabalho de 0°C e uma concentração de 4 g/L de KHT, assim como classificações de estabilidade quando $Mc < 20/25\text{ }\mu\text{S/cm}$ e de risco quando $Mc > 40/45\text{ }\mu\text{S/cm}$ (Cabrita et al., 2016) (sem especificação do tipo de vinho), outras referências indicam $Mc < 10\text{ }\mu\text{S/cm}$ como valor de estabilidade para vinhos licorosos (Benítez et al., 2003b) e outros propõem a utilização de percentagem de diminuição de condutividade, ao invés do seu valor absoluto, considerando que vinhos com valores abaixo de 3% são estáveis (Cabrita et al., 2016); também em percentagem, outros artigos referem estabilidade em vinhos tintos com $Mc < 5\%$, valores de risco entre 5 e 10% e instabilidade acima deste último valor (Vernhet, 2019).

2.5 Estabilização da Matéria Corante

A cor é uma das caraterísticas mais importantes na qualidade do vinho. No decorrer do envelhecimento, o vinho tinto passa de vermelho vivo a um tom mais alaranjado, caraterístico dos vinhos do Porto velhos, devido a uma redução no teor de antocianinas, pigmentos vermelhos

presentes nas uvas (Ricardo-da-Silva & Laureano, 2004). Estes compostos são muito sensíveis à oxidação e, com o tempo, tornam-se instáveis devido a reações de precipitação e degradação (Enartis, 2019). Além disso, alguns compostos fenólicos responsáveis, também, pela característica da cor nos vinhos, com o tempo e favorecidos pela formação de cristais tartáricos, podem precipitar durante o período de conservação (Canas et al., 2000) criando um depósito no fundo das garrafas.

Para estabilização da cor, depois da filtração do vinho é adicionada goma arábica, uma resina natural constituída por polissacarídeos e glicoproteínas, que melhora as características sensoriais do vinho e assegura a estabilização corante.

3 Materiais e Métodos

3.1 Seleção e Preparação dos Vinhos de Teste

Todos os vinhos utilizados neste trabalho são do tipo vinho do Porto da categoria *Tawny*, uma vez que é nestes que se considera haver maior interesse de aplicação e estudo; não só pelo seu valor de mercado, mas por estarem associados a longos períodos de envelhecimento e cujo consumo poderá não ser imediato, pelo que haverá uma maior tendência de formação de cristais por instabilidade. Por uma questão de confidencialidade, os vinhos não serão totalmente identificados.

Tratando-se do estudo de um produto de estabilização de Ca, importa, obviamente, que os vinhos selecionados sejam instáveis relativamente a este parâmetro, para que este seja aplicado de forma adequada e que possa ser avaliada a sua eficácia. O primeiro critério de escolha dos vinhos de teste, numa fase muito inicial, foi a presença de cristais no produto engarrafado depois de algum tempo em garrafeira; o que indicaria a instabilidade relativamente ao CaT, uma vez que estes vinhos teriam sido submetidos a tratamentos de estabilização tartárica para o KHT. Por este método foi possível selecionar e retirar amostras do lote que lhes tinha dado origem. Outro dos critérios de seleção foi a concentração de Ca que, embora não seja linear (mais Ca não significa maior instabilidade), funcionou como ponto de partida. Por fim, e também de forma a aumentar o leque de análise, selecionaram-se alguns vinhos velhos que se pensaram de relevante avaliação. Além de todas estas razões, a escolha para os ensaios finais deveu-se, também, à disponibilidade do vinho em armazém, nomeadamente às quantidades disponíveis e ao seu valor de mercado, uma vez que seria necessário dispensar um volume de cerca de 20 L.

Partindo do vinho no seu estado “bruto”, tal como referido, foi necessário realizar um tratamento, antes da adição do produto de estabilização. Este tratamento, comumente designado por colagem (Carvalheira, 2018), é uma técnica que remove partículas indesejadas e reduz a turbidez do vinho, dando origem a vinhos mais limpos e brilhantes (Youssef El Rayess, 2016). A colagem envolve a adição de agentes clarificantes, designados como coloides, que interagem com as partículas suspensas, formando aglomerados de maiores dimensões que se depositam e são mais facilmente removidos (Ribéreau-Gayon et al., 2021). Antes de serem iniciados os ensaios, foi realizada a colagem aos vinhos de teste, pela adição de duas bentonites distintas, em dosagens apropriadas, que, por uma questão de confidencialidade, não serão desvendadas. Depois da adição desses produtos, os vinhos ficaram em repouso durante um período de 5 dias, foram tirados a limpo e só depois utilizados para os seguintes ensaios.

Como já referido, nem todos os vinhos necessitam de tratamento com CaT micronizado, uma vez que nem todos eles apresentam instabilidade relativa aos iões de Ca em solução. Sendo assim, é importante saber como avaliar o seu grau de estabilidade.

3.2 Testes de Estabilidade

Tendo em conta que os instrumentos de análise de condutividade e o método do frio (utilizados para avaliação da estabilidade tartárica do KHT) não apresentam utilidade para a mesma avaliação relativa ao CaT, foi necessário, por parte da empresa produtora de CaT micronizado, o desenvolvimento de um método que permitisse concluir acerca da estabilidade do vinho. Assim, os seus utilizadores são capazes de avaliar a necessidade de aplicação do produto. Um desses métodos baseia-se na análise da concentração de Ca no vinho antes e após a adição de uma quantidade elevada de produto, 400 g/hL. Esta concentração é superior à dose máxima legal, 200 g/hL (Europeia, 2019), e o objetivo da sua adição é a sobressaturação da solução e criação de pequenos núcleos, de forma a ultrapassar a etapa limitante do processo e forçar a cristalização. A quantificação de Ca é realizada por espectrofotometria de absorção atómica (EAA) à chama e, de acordo com a sua variação, o vinho é considerado estável, ligeiramente instável ou instável, conforme a Tabela 5. No caso de instabilidade, o protocolo fornecido refere a adição de uma dose *standard* de 50 g/hL, independentemente do valor obtido.

Tabela 5: Valores de referência para determinação do nível de estabilidade do vinho.

Valores de Referência $\Delta[\text{Ca}]$ (mg/L)	
$\Delta[\text{Ca}] < 15$	Estável
$15 \leq \Delta[\text{Ca}] \leq 25$	Ligeiramente instável
$\Delta[\text{Ca}] > 25$	Instável

A aplicação deste teste, por parte do laboratório produtor, a centenas de vinhos ao longo de três anos, permitiu a construção de uma base de dados sólida a partir da qual foi desenvolvido um método estatístico multifatorial, baseado no algoritmo de *Yales*. Este método permite estimar o nível de instabilidade do vinho a partir dos valores de pH, concentração de ácido tartárico e Ca. Embora não seja partilhado publicamente, é dada aos utilizadores a possibilidade de enviar os três parâmetros referidos, relativos aos vinhos a tratar, sendo-lhes devolvido o nível de instabilidade, assim como uma dose recomendada de produto a administrar, que poderá ou não, corresponder aos 50 g/hL, sugeridos como forma geral de tratamento.

A nível experimental, foram realizados os dois testes de forma a poder efetuar comparações e retirar conclusões, pelo que se começou pela determinação dos parâmetros pedidos de 18

vinhos velhos distintos da categoria Tawny, segundo os métodos que serão, posteriormente, descritos. Paralelamente, foram preparadas as soluções com dois vinhos distintos e 0,4 g de CaT micronizado, em frascos de 100 mL, que se mantiveram em agitação durante o tempo proposto em protocolo (15 min) e mantidas a -4 °C durante as 24 horas seguintes. Depois do tempo de repouso, as amostras foram centrifugadas e filtradas a vácuo com uma membrana de 0,45 µm, cujas informações podem ser consultadas na Tabela 7, e foi determinada a concentração final de Ca. Por diferença com o valor inicial no vinho calculou-se a variação de cálcio e determinou-se o grau de estabilidade do mesmo. Este processo foi, também, realizado aos 18 vinhos e, juntamente com os resultados então obtidos do laboratório externo, foram selecionados aqueles que seriam utilizados para os ensaios seguintes.

3.3 Tratamento com CaT Micronizado

Para a aplicação do produto, tanto na realização do teste de estabilidade como na fase de tratamento propriamente dita, é sugerido que seja realizada numa remontagem e com uma prévia diluição em vinho na proporção 1:20, além de que o produto deve ser mantido em suspensão até à sua completa homogeneização. É, ainda, referido que durante o tratamento, o vinho deve estar a uma temperatura entre 10 a 15 °C e que, depois de homogeneizado, o produto deve estar em contacto com o vinho durante 7 a 15 dias. Ao fim deste tempo, o vinho deverá ser filtrado de forma a retirar o produto e os cristais de CaT formados.

3.3.1 Teste de Variáveis

Como é possível verificar, algumas das variáveis como o tempo de agitação (“até à completa homogeneização”) e, ainda, o tempo de repouso sugerido (7 a 15 dias), não são totalmente objetivas no protocolo, deixando um grande nível de liberdade por parte do utilizador. Por esta razão, a primeira etapa do trabalho consistiu no estudo destas variáveis, com o intuito de determinar os tempos ótimos para cada uma delas. Para testar quais os tempos que levariam à maior redução de Ca por adição do produto, utilizaram-se dois vinhos distintos (*Tawny* e *Tawny* 20 anos), escolhidos por apresentarem caraterísticas semelhantes às dos vinhos a tratar e por questões de disponibilidade de volume.

A realização do teste consistiu na adição, a 60 mL de vinho, da dose máxima legal de produto (200 g/hL) de acordo com as condições descritas em protocolo. Testaram-se 4 tempos de agitação distintos - 30 min, 1h, 2h e 4h - combinados com 7 ou 15 dias de repouso, ao fim dos quais se determinou, novamente, o teor em Ca. Por diferença com o valor inicial, foi possível calcular a remoção para cada uma das diferentes combinações e seleccionar, então, aquela que seria mais adequada para os ensaios posteriores.

3.3.2 Aplicação do Produto para Tratamento

A aplicação do produto no tratamento propriamente dito, foi realizada de acordo com o protocolo indicado pelos fornecedores e com base nos tempos de agitação e repouso determinados. As doses aplicadas foram decididas de acordo com a dose recomendada pelo laboratório externo, tendo sido testadas, também, uma dose inferior e outra superior à indicada.

Para um volume de 750 mL, correspondente a uma garrafa, calculou-se o volume (em mL) a adicionar durante a dissolução inicial do produto - o equivalente a 20 vezes a massa de produto. Deixou-se em agitação durante 15 minutos, tempo ao fim da qual a suspensão foi adicionada ao restante volume da garrafa, que ficou, depois, em agitação durante 1 hora. Passadas 24 horas levantou-se novamente a suspensão, colocando em agitação durante o mesmo período. A garrafa permaneceu tapada durante todo o processo e, logo após o tempo de agitação, foi retirada a banda magnética e a garrafa preenchida com azoto, antes de ser finalmente fechada e colocada em repouso durante 15 dias. Depois do tempo de repouso o vinho foi filtrado para novas garrafas que foram, mais uma vez, preenchidas com azoto e tapadas com rolhas de cortiça. Para cada um dos vinhos e cada uma das doses, foram preparadas 6 garrafas, sendo que uma delas seria submetida à análise físico-química e outra à análise sensorial; a referência controlo, a ser armazenada sem adição de qualquer outro produto; e as restantes, designadas por referência 1,2 e 3, às quais seriam adicionadas diferentes doses de produtos de estabilização de matéria corante e tartárica (que não serão reveladas), para avaliar o seu desempenho em relação à garrafa controlo, durante um período de cerca de 3 anos em garrafeira.

3.3.3 Filtração

Depois de aplicado o produto e deixado em repouso durante o tempo determinado, foi necessário remover o excesso, assim como possíveis cristais que tenham precipitado durante o tempo de contacto. Segundo os fornecedores, esta remoção é realizada através de uma filtração com uma membrana de 0,45 μm . No entanto, por não se tratar de uma prática de possível implementação a nível de armazém, uma vez que a porosidade mínima utilizada nesse contexto, em vinhos do Porto tintos, é de 1,2 μm , foram realizados alguns testes de filtração, de forma a perceber se filtros com essa porosidade levariam, de igual forma, à remoção total de produto adicionado. A filtração, em armazém, é inicialmente realizada com filtros de placas de celulose, com porosidades variadas, Tabela 6, de acordo com o vinho a filtrar; em alguns casos, são ainda utilizados filtros de cartucho, de forma a reduzir a porosidade a 1,2 μm . As placas, da marca *Fibrafix*, acrescentam, no entanto, sabores e aromas indesejados ao vinho e estão associadas a uma perda significativa de cor, principalmente numa fase inicial de utilização, o que representa, obviamente, uma grande desvantagem ao seu uso. Para combater

isto, fazem-se passar pelas placas alguns litros de outro vinho antes de proceder à filtração, para que o primeiro impacto não se faça sentir no vinho a engarrafar.

Tabela 6: Placas de celulose disponíveis da marca Fibrafix e respetivas porosidades.

Tipo de placa	Porosidade (μm)
AF 9	30-10
AF 20	15-6,0
AF 30	12-5,0
AF 50	6,0-3,0
AF 70	3,0-1,5

Nos ensaios de laboratório, onde o objetivo é filtrar uma quantidade reduzida de garrafas e onde o volume de vinho disponível era reduzido, assim como a área de filtração muito inferior à escala de armazém o que poderia levar à colmatação; não seria uma possibilidade fazer passar pela mesma um outro vinho, para “desgastar” a placa e fazer com que, nas garrafas de teste, o impacto não fosse sentido. Sendo assim, foram testadas algumas alternativas de filtração, recorrendo a filtros de celulose, para que, no caso de semelhança de resultados, fosse utilizado este método nas garrafas que seriam submetidas a análise sensorial. Para avaliar a eficácia da filtração, começou por se determinar a turbidez inicial de uma amostra de vinho *Tawny Reserva* (limpo), à qual se adicionou, de seguida, uma quantidade correspondente à dose máxima legal de CaT micronizado, de acordo com o protocolo dos fornecedores. Mediu-se novamente a turbidez e a filtração foi realizada em duas etapas, à pressão de 0,5 bar, no sistema representado na Figura 12: numa primeira fase, fez-se passar o vinho pelo filtro de porosidade compreendida entre 1-6 μm , juntamente com o de 5 μm e, numa segunda fase, pelos filtros de 3 e 1,2 μm . Na Tabela 7, podem ser verificadas as informações acerca dos filtros utilizados, assim como a marca, referência e porosidade. No final da filtração, mediu-se novamente a turbidez do vinho e comparou-se com a inicial, o que permitiu concluir acerca da remoção do produto adicionado. O mesmo ensaio foi realizado utilizando as placas AF 70, acrescidas ao filtro de 1,2 μm (que faria o lugar do filtro de cartucho), para garantir que a porosidade final era a mesma em ambos os processos. Compararam-se os valores de turbidez resultantes e foram, então, retiradas as conclusões acerca da similaridade dos processos.

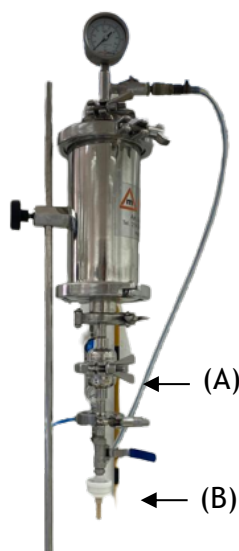


Figura 12: Esquema de filtração utilizado nos testes laboratoriais. (A) e (B) correspondem aos locais onde são colocados filtros com diâmetros de 47 e 25 mm, respetivamente.

Tabela 7: Informações relativas aos diferentes filtros utilizados no processo de filtração.
Todos os filtros são hidrofílicos e não-estéreis.

Porosidade (μm)	Material	Diâmetro (mm)	Marca	Referência
1-6	Fibra de Vidro	47	Amazon Filters	16DISC/FPW00V
5	Celulose	25	Merck Millipore	SMWP02500
3	Celulose	47	Merck Millipore	SSWP04700
1,2	Celulose	25	Merck Millipore	RAWP02500

De forma a concluir acerca da remoção de cálcio obtida pela passagem pelo filtro de 1,2 μm em relação à membrana de 0,45 μm , determinou-se a concentração de cálcio final obtida depois de cada um dos métodos de filtração e compararam-se os resultados. No processo 3, além da membrana de 0,45 μm , o vinho teste foi filtrado, também, com a placa AF 70. Na Tabela 8 estão resumidos os diferentes processos de filtração.

Tabela 8: Tabela resumo dos diferentes processos de filtração testados, todos eles realizados à pressão 0,5 bar.

Processo de Filtração 1	1ª Etapa: Filtro 1-6 μm ; Filtro 5 μm 2ª Etapa: Filtro 3 μm ; Filtro 1,2 μm
Processo de Filtração 2	Placa AF 70; Filtro 1,2 μm
Processo de Filtração 3	Placa AF 70; Filtro 0,45 μm

3.4 Análise Físico-Química

De forma a garantir a qualidade dos vinhos como produto final, é fundamental que alguns parâmetros sejam avaliados ao longo do seu processo de produção e envelhecimento. À amostra destinada a análises físico-químicas realizaram-se testes aos parâmetros pH, concentração de Ca e concentração de ácido tartárico, com o intuito de enviar novamente os valores para o laboratório externo e concluir acerca da estabilidade depois do tratamento, comparando ainda com o teste laboratorial, a realizar novamente. Foi ainda avaliada a AT, cor, turbidez, teor em álcool e MV, valores que foram comparados com aqueles que tinham sido determinados antes da realização de qualquer tratamento, permitindo concluir a influência da adição do produto nos mesmos.

3.4.1 pH

Além da sua importância para este estudo em específico, o pH trata-se de um dos parâmetros mais importantes para o enólogo no que toca à acidez dos vinhos, uma vez que, por representar a acidez “real”, permite retirar conclusões acerca da suscetibilidade a contaminações microbianas e oxidações, à possibilidade de crescimento de leveduras e regulação de mecanismos de fermentação. Este valor encontra-se, geralmente, entre 3,0 e 6,0, situando-se, nos vinhos em análise, entre 3,0 e 3,8. A análise deste parâmetro é baseada em métodos de potenciometria, que calculam o valor de pH através da determinação de uma diferença de potencial medidos em dois elétrodos mergulhados na solução - um de referência com um potencial constante e conhecido, e outro eletrodo de vidro, sensível aos iões de H^+ , que mede o potencial do meio em análise (Curvelo-Garcia, 1988; Tools, 2023). Internamente, utiliza-se um eletrodo combinado de pH do modelo *InLab Science* da marca *Mettler Toledo*.

3.4.2 Acidez Total

Em enologia, são distinguidos três termos relacionados com acidez: o pH, a acidez total (AT) e a acidez volátil (AV), que apresentam diferentes influências nas características organoléticas dos vinhos. Todos estes são parâmetros analisados e apresentados diariamente em controlo de qualidade, o que demonstra a sua importância. A AT, também denominada como acidez titulável a pH=7, representa a disponibilidade potencial de iões H^+ no vinho (Curvelo-Garcia, 1988) e é determinada por neutralização, utilizando uma solução de hidróxido de sódio de concentração conhecida (Ribéreau-Gayon et al., 2021). No método de titulação pode recorrer-se a um indicador como a fenolftaleína ou o azul de bromotimol ou, preferencialmente, a um eletrodo medidor de pH que, por indicar os valores de forma instantânea, à medida que é adicionada a solução alcalina, permite que o ensaio seja terminado no ponto de pH=7 (a 20 °C), de forma mais exata.

A AT engloba todos os tipos de ácidos presentes, independentemente da sua volatilidade, nomeadamente os principais ácidos orgânicos referidos anteriormente e ainda ácidos inorgânicos. A contribuição de cada um deles no valor da AT é determinada pela sua força, que define o seu estado de dissociação. O dióxido de carbono (CO_2), quando presente, altera de forma significativa os resultados da AT, pelo que, principalmente em vinhos novos, recentemente fermentados (etapa onde se formam grandes quantidades de CO_2), deve ser realizada descarbonização antes da análise a este parâmetro (IVDP, 2018; Ribéreau-Gayon et al., 2021). Relativamente aos vinhos em análise, considera-se que esta etapa não é aplicável, uma vez que, por se tratarem de vinhos velhos, já terão perdido, durante o envelhecimento, todo ou a maioria do CO_2 presente.

Num gobelé de 100 mL são colocados 5 mL de amostra de vinho, cerca de 75 mL de água desionizada e uma barra magnética. Com agitação constante e com o eletrodo de medição de pH colocado, é adicionada, gota a gota, a solução de hidróxido de sódio até que o pH seja igual a 7. Pelo volume gasto (V_1), em mL, e recorrendo à Equação 7, é possível calcular a AT expressa em g/L de ácido tartárico, tendo em conta, ainda, a concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada (c_{NaOH}), a massa molar do ácido tartárico ($M_{\text{H}_2\text{T}}$) e o volume de amostra de vinho (V_2) em análise, também em mL. No caso do método realizado, $c=0,1106$ mol/L e $V_2=5$ mL.

$$AT \text{ (g/L ácido tartárico)} = \frac{V_1 \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{H}_2\text{T}}}{2 \cdot V_2} \quad (\text{Eq.7})$$

Segundo o Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP), o valor de AT nos vinhos tintos deve ser igual ou superior a 3,0 g/L de ácido tartárico.

3.4.3 Concentração de Ácido Tartárico

A determinação da concentração de ácido tartárico nos vinhos é realizada diariamente no laboratório de qualidade da empresa, a partir do equipamento WineScan™ Flex da marca FOSS, capaz de analisar, automaticamente outros parâmetros como a MV, teor alcoólico, AV e AT, pH, etc., a partir de um volume de amostra de cerca de 30 mL. Este equipamento utiliza a metodologia de espectroscopia infra-vermelho (IV) com transformada de Fourier (FTIR), que se baseia em alterações de energia vibracional das moléculas quando lhes é incidida uma radiação IV que pode, ou não, ser por elas absorvida (Bauer et al., 2008). O sinal resultante no detetor, é um espectro característico de cada molécula, cujos picos correspondem a frequências de vibração de cada uma das partes da mesma (Stuart, 2004). O princípio por detrás da técnica de FTIR envolve a interferometria, onde o feixe de luz IV é dividido em dois caminhos: o caminho da amostra e o caminho de referência, que são depois combinados e a interferência resultante medida por um detetor. A interferência é analisada através da transformada de Fourier, que permite obter o espectro de absorção da amostra de forma mais rápida e eficaz uma vez que,

por impedir a dispersão da luz, faz com que toda a radiação seja direcionada para o interferómetro (Stuart, 2004) e depois para amostra.

Os principais componentes de um espectrofotómetro FTIR estão representados esquematicamente na Figura 13. A radiação emergente da fonte é passada pelo interferómetro até a amostra em análise, antes de chegar ao detetor. Após a amplificação da amostra, no qual são eliminadas interferências de alta frequência, os dados são convertidos para a forma digital e transferidos para o computador. As vantagens do FTIR incluem sua alta sensibilidade, rapidez de análise, não destrutividade, necessidade mínima de preparação de amostra e capacidade de análise de uma ampla variedade de substâncias (Bauer et al., 2008).

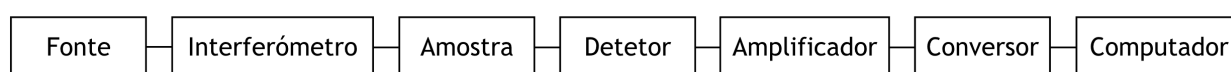


Figura 13: Componentes básicos de um espectrofotómetro FTIR. Adaptado de Stuart (2004).

Além da análise da concentração de ácido tartárico recorrendo ao método descrito, foram, também, enviadas amostras de cada um dos vinhos para o IVDP que, por eletroforese capilar, determina a concentração de ácido tartárico, permitindo a confirmação dos valores obtidos internamente por FTIR.

3.4.4 Concentração de Cálcio

Para a determinação da concentração de Ca nas diferentes amostras de vinho em análise, utiliza-se o método de EAA à chama (Mozaz et al., 1999). Esta é uma técnica extremamente sensível, seletiva e simples, capaz de detetar concentrações na ordem das partes por milhão e bilião (Alves, 2018). O espectrofotómetro de absorção atómica à chama é constituído por uma fonte, normalmente uma lâmpada de cátodo oco, que possui um tubo metálico revestido do elemento a quantificar, permitindo a emissão de uma radiação muito intensa apenas no comprimento de onda correspondente às bandas de absorção do átomo ou elemento em análise; um atomizador, composto por um nebulizador que converte a amostra líquida num aerossol que, por sua vez, é alimentado ao queimador onde ocorre a sua volatilização (Wu et al., 2009); um seletor de comprimento de onda; um detetor e, ainda, um processador de sinal. A temperatura da chama, presente no atomizador, depende do par combustível/ oxidante utilizados, e tem um papel determinante na fiabilidade da análise, diferindo de acordo com a energia requerida pela substância a analisar (Alves, 2018). No caso específico da análise ao elemento Ca, o equipamento utilizado foi um *AA Spectrometer* da marca *Thermo Scientific*, equipado com um queimador alimentado a ar/ acetileno (2100-2400 °C) e uma lâmpada de cátodo oco com 6 mA. As medições foram realizadas a um comprimento de onda de 422,7 nm e segundo o método *OIV-MA-AS322-04 Calcium* da OIV (*International Organisation of Vine and Wine*) (OIV, 2022).

Antes da leitura das amostras propriamente ditas, é necessário realizar a medição a uma série de padrões que constituem a reta de calibração, que relaciona a concentração de cálcio na amostra com a absorvância lida pelo equipamento. Começam-se por preparar, a partir de dois padrões sintéticos (material de referência certificado), de duas marcas distintas, com concentração de cálcio conhecida (1000 mg/L) e acidificados a 2% de ácido nítrico, duas soluções-mãe com $[Ca] = 100$ mg/L, diluídas em água desionizada. Os 5 padrões (P) para construção da reta são, então, preparados, a partir de uma dessas soluções, com concentrações crescentes de Ca (1 a 5 mg/L), com 10% de cloreto de lantânio e o restante de água desionizada. Da mesma forma, mas partindo da outra solução-mãe, obtêm-se duas outras soluções (Q) com $[Ca] = 2$ e 3 mg/L, que serão utilizadas como padrões de validação da reta de calibração e lidas de 10 em 10 amostras, durante as corridas. As amostras para análise são preparadas em balões volumétricos de 20 mL, contendo 1 mL de vinho, 2 mL de cloreto de lantânio e o restante, novamente, em água desionizada. Da mesma forma, é preparado um padrão de referência interno, cujo vinho utilizado é de concentração de cálcio conhecida, determinada pelo IVDP. Este padrão é lido, também, no início e no fim de todas as corridas. Sendo a gama de trabalho de 1 a 5 mg/L, dada pelas concentrações dos padrões P, é importante que amostras com valores fora da gama de trabalho sejam devidamente diluídas, de forma a garantir uma maior fiabilidade nas medições.

A reta de calibração, assim como os respetivos parâmetros de validação da mesma, são apresentados no Apêndice A.

3.4.4.1 Método Estatístico

Os resultados obtidos por EAA à chama são comparados entre eles recorrendo a um método estatístico, que permite determinar se as diferenças observadas entre as concentrações finais de cálcio são, ou não, estatisticamente significativas, de forma a que possam ser retiradas conclusões fundamentadas acerca da eficácia do produto. O método utilizado é de *Mann-Whitney*, associado a um grau de confiança de 95% e foi realizado recorrendo ao *software Graphpad Prism 9*, que realiza os cálculos de forma automática e devolve apenas os resultados.

3.4.5 Turbidez

A turbidez é um parâmetro que avalia o grau de sólidos suspensos no vinho, indicando o seu estado de clarificação e limpidez (Iland, 2004). É expressa em Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) e é determinada através dos princípios de nefelometria, que avalia a extensão com que a luz é dispersa pelas partículas suspensas na amostra. Nos vinhos do Porto tintos utilizados, a turbidez não deve ser superior a 3,5 NTU, segundo critérios internos. O equipamento utilizado para a determinação da turbidez é o *2100Q Portable Turbidimeter* da marca *HACH*.

3.4.6 Avaliação da Estabilidade Tartárica (K)

3.4.6.1 Método do Mini-contacto

O método utilizado, baseado no manual de utilização do equipamento, *Check Stab Alfa 2012* da marca *Delta Acque*, refere o seguinte protocolo (Acque, 2013): uma amostra de 100 mL de vinho é colocada num gobelé que, por sua vez, é inserido num banho de refrigeração a -4°C , a agitação constante; no vinho, é inserida uma célula condutimétrica, responsável pela medição da condutividade da solução ao longo do tempo de ensaio e um agitador, que garante que toda a amostra se encontra à temperatura do banho; são colocados 1 ou 2 g de KHT para vinhos brancos ou tintos, respetivamente, e o ensaio decorre durante períodos de tempo distintos de acordo com o tipo de vinho selecionado no *software*; os resultados são apresentados na forma de gráfico, junto dos valores de precipitação total em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e % e a classificação é dada de acordo com os intervalos na Tabela 9, ajustada internamente para vinhos do Porto tintos.

Tabela 9: Determinação do nível de estabilidade tartárica de vinhos do Porto tintos de acordo com M_c ($\mu\text{S}/\text{cm}$), verificada pelo método de mini-contacto. (Adaptado do procedimento interno da empresa Symington Family Estates, Vinhos S.A).

Classificação	M_c ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Muito Estável	< 12
Estável	12 - 18
Zona de Risco	18 - 30
Instável	> 30

Este método foi realizado numa fase final à amostra relativa à análise físico-química, de forma a avaliar a estabilidade tartárica relativa ao K e justificar a necessidade da adição de KPA nas garrafas para referência.

3.4.7 Estabilização de Matéria Corante

A estabilização de matéria corante foi realizada no final de todo o procedimento, logo após a filtração; sendo as doses de produto a adicionar distintas de acordo com a garrafa de referência 1, 2 ou 3. As doses foram sugeridas pelos enólogos internos e não serão reveladas, uma vez que as conclusões acerca da sua eficiência não estão, propriamente, no âmbito deste trabalho.

3.5 Análise Sensorial

A análise sensorial do vinho é uma prática fundamental na apreciação e avaliação desta bebida. Através do paladar, olfato e visão, especialistas são capazes de explorar as caraterísticas únicas do vinho e avaliar a sua qualidade, complexidade e equilíbrio (Agrovin, 2021). Compreende três etapas: uma inicial de observação do vinho, em que é avaliada a sua transparência, limpidez ou presença de partículas indesejadas em suspensão, assim como a intensidade da cor, o brilho e a viscosidade; numa segunda fase é realizada a identificação e avaliação dos diferentes aromas libertados pelo vinho, podendo estes ser classificados como frutados, florais, amadeirados, etc; e, por fim, através do paladar e, de forma a analisar todo o sabor do vinho fazendo-o passar por todas as regiões da língua, o provador analisa a acidez, o amargor, a doçura, o álcool e a tanicidade, caraterística de vinhos mais “ásperos” (Agrovin, 2021; Jackson, 2022). A análise sensorial ao vinho permite controlar e corrigir as suas caraterísticas, antes do seu engarrafamento e ainda identificar defeitos que possam surgir durante o envelhecimento ou durante as restantes etapas da sua produção (Crane, 2019).

A prova cega realizada neste estudo foi realizada de acordo com a folha de prova no Apêndice B e baseia-se em 3 parâmetros: aroma, paladar e impacto visual, com o objetivo de concluir se o tratamento e, posterior, filtração, têm impacto nas qualidades do vinho, ou se mantém as suas caraterísticas intactas. Contou com quatro provadores internos, que compararam cada uma das 4 amostras, depois de tratamento com diferentes doses de produto, à amostra controlo. Foi ainda incluída a amostra de controlo filtrado, correspondente ao vinho sem adição de produto, mas apenas submetido à filtração, de forma a avaliar o impacto do processo no aspeto visual do vinho e, ainda, no seu sabor e aroma. A avaliação a nível de paladar e aroma foi realizada segundo uma escala de 0-20 e o impacto visual de acordo com a seguinte escala, sempre em comparação ao vinho controlo: 1- sem impacto; 2- ligeiro impacto e 3- impacto visual excessivo.

Na Figura 14 está representado o esquema de todo o processo experimental para aplicação do CaT micronizado.

Resultados e Discussão

33

4 Resultados e Discussão

4.1 Teste de Variáveis

Conforme referido anteriormente, esta etapa consistiu na determinação dos tempos de agitação e repouso que levariam a uma maior remoção de Ca pela adição do CaT micronizado. Na Tabela 10 encontram-se os resultados relativos à remoção de Ca observada em cada uma das amostras em análise, representando, cada valor, a média de ensaios em duplicado para cada uma das diferentes combinações de variáveis.

Tabela 10: Resultados de $\Delta[\text{Ca}]$ (mg/L) relativos a cada um dos ensaios de teste de variáveis - tempo de agitação e tempo de repouso.

$\Delta[\text{Ca}]$ (mg/L)		Tempo de Repouso			
		Tawny		20A	
		7 dias	15 dias	7 dias	15 dias
Tempo de Agitação	30 min	15,7	21,1	3,9	5,0
	1 h	18,2	24,6	5,0	5,7
	2 h	18,4	23,9	4,5	5,9
	4 h	18,9	23,9	4,0	4,5

É possível verificar que, para ambos os vinhos se obtiveram melhores resultados quando o contacto com o produto decorreu durante 15 dias, que se traduziu numa maior remoção de Ca, dada pela variação da sua concentração; no entanto, para o vinho *Tawny* a combinação mais eficiente seria com uma hora de agitação, distinto do 20A, para o qual as duas horas se mostraram ligeiramente mais eficientes. Tendo como objetivo determinar uma combinação de tempos ótima para aplicação na generalidade dos vinhos, decidiu-se optar pelos 15 dias combinados com uma hora de agitação (Tabela 11), uma vez que a diferença na remoção não seria suficientemente significativa (0,2 mg/L) que compensasse o dobro do tempo de agitação. Além disso, por se tratar de um procedimento a implementar, posteriormente, em armazém, para aumentar o tempo de agitação de forma proporcional aos grandes volumes a tratar nesse contexto, seriam necessários períodos muito longos, o que acarretaria, obviamente, um aumento de custos de operação.

Tabela 11: Tempo de agitação e repouso determinados para aplicação do produto nos restantes ensaios com CaT micronizado.

Tempo de agitação	1 hora
Tempo de repouso	15 dias

4.2 Testes de Estabilidade

A fase seguinte do trabalho consistiu na determinação da estabilidade dos vinhos, de forma a seleccionar aqueles que seriam utilizados nos testes posteriores por serem instáveis em relação ao ião em estudo, Ca. Foram determinados, pelos métodos já enunciados, os valores de pH, ácido tartárico e concentração de Ca, encontrando-se os resultados na Tabela 12. Na mesma tabela, encontram-se, também, os resultados dos testes de estabilidade, tanto pela adição de produto, como os enviados pelo laboratório produtor do CaT micronizado.

Tabela 12: Parâmetros físico-químicos relativos aos vinhos do Porto velhos em análise e respetivos resultados dos testes de estabilidade realizados. A classificação dada pode ser E - Estável, LI- Ligeiramente Instável e I- Instável e “Dose Rec.” corresponde à dose recomendada pelo laboratório produtor.

ID	pH	Ácido Tartárico (g/L)	[Ca _{inicial}] (mg/L)	Teste Experimental			Resultados Laboratório	
				[Ca _{final}] (mg/L)	Δ[Ca] (mg/L)	Classificação	Dose Rec. (g/hL)	Classificação
1	3,51	1,3	75,2	68,4	6,8	E	20	LI
2	3,29	1,3	91,6	86,3	5,3	E	30	LI
3	3,42	1,4	83,0	73,4	9,6	E	50	I
10A	3,55	1,4	77,6	50,6	27,0	I	30	I
			70,3	44,4	25,9	I		
4	3,36	1,4	76,1	68,1	8,0	E	0-10	LI
5	3,40	1,2	92,9	82,2	10,7	E	40	I
6	3,49	1,3	69,6	61,8	7,8	E	0-10	LI
7	3,39	1,5	72,6	72,2	0,4	E	0-10	LI
8	3,44	1,5	52,8	52,8	0,0	E	0	E
RSV	3,26	1,4	117,6	99,2	18,4	LI	50	I
			113,3	97,5	15,8	LI		
9	3,53	1,4	45,2	41,1	4,1	E	0	E
10	3,50	1,3	59,1	49,5	9,5	E	0	E
11	3,43	1,3	84,7	80,5	4,2	E	30	I
12	3,29	1,3	64,6	54,3	10,3	E	0	E
14	3,59	1,5	60,9	41,8	19,1	LI	0	LI
15	3,49	1,3	55,2	45,1	10,1	E	0	E
16	3,47	1,2	69,7	60,3	9,3	E	0-10	LI
17	3,45	1,3	66,2	58,6	7,5	E	0	E
18	3,48	1,4	65,8	62,0	3,8	E	0	LI

Além disso, foi determinado o teor alcoólico, a massa volúmica e a AT com o intuito de, no final, concluir acerca do impacto do tratamento nestes parâmetros, resultados apresentados posteriormente.

Como é possível verificar, para alguns dos vinhos, os resultados obtidos por cada um dos métodos foram discordantes; pelo que, por tentativa de esclarecimento com o laboratório

produtor, foi sugerida uma maior confiança no teste laboratorial face aos resultados obtidos pelo algoritmo. A discrepância dos valores foi justificada pelo facto do método de cálculo se tratar de um método “exagerado”, com maior tendência de classificações de instabilidade: vinhos estáveis pelo método experimental podem aparecer como ligeiramente instáveis ou instáveis pela outra avaliação, mas, tendo em conta que o contrário não acontece, esta justificação pode ser considerada aceitável. No entanto, por não ser dado acesso ao método, não foi possível retirar mais conclusões.

Foram seleccionados os vinhos 10A e RSV para os ensaios de aplicação de produto, por terem apresentado instabilidade em ambos os métodos de avaliação. O vinho 14 foi também um potencial candidato à seleção, no entanto, por falta de disponibilidade de volume, não foi possível proceder à sua análise em ensaios seguintes. Por uma questão de segurança de resultados, e para reduzir as diferenças de amostragem, depois de seleccionados e ser requisitado o volume necessário para os ensaios posteriores, realizou-se novamente o teste laboratorial, para a qual se obtiveram classificações idênticas às anteriores. Os resultados deste segundo teste de estabilidade estão também tabelados (Tabela 12).

4.3 Aplicação do Produto

Partindo da recomendação de tratamento para cada um dos vinhos, decidiram-se as doses inferior e superior a ser testadas, além da dose recomendada pelo laboratório externo. Para o 10A foi sugerida uma dose de tratamento de 30 g/hL, correspondendo 10 g/hL e 50 g/hL às doses inferior e superior, respetivamente. O RSV teve 50 g/hL como dose recomendada de tratamento, pelo que a dose inferior tomou um valor de 30 g/hL e a superior de 70 g/hL. Como descrito no capítulo anterior, a adição do produto implica uma primeira dissolução no vinho, numa proporção de 1:20, dependente da massa de produto a adicionar em cada uma das garrafas, sendo que os valores calculados podem ser consultados na Tabela 13.

Tabela 13: Informações relativas à etapa de adição do produto: massa de produto (g) a adicionar correspondente a cada dose e respetivos volumes de dissolução inicial e final (mL), calculados para garrafas de 750 mL.

		Dose (g/hL)	Garrafa 750 mL		
			m (g)	V _i agitação (mL) m(g) x 20	V _f (mL) 750 - V _i agitação
10A	Dose Inferior	10	0,075	1,5	748,5
	Dose Recomendada	30	0,225	4,5	745,5
	Dose Superior	50	0,375	7,5	742,5
RSV	Dose Inferior	30	0,225	4,5	745,5
	Dose Recomendada	50	0,375	7,5	742,5
	Dose Superior	70	0,525	10,5	739,5

4.4 Filtração

Os resultados correspondentes aos testes de filtração podem ser observados na Tabela 14, onde são apresentadas a turbidez e concentração de Ca, antes e depois da adição de produto e, ainda, depois dos diferentes processos de filtração.

Tabela 14: Resultados de turbidez (NTU) e concentração de Ca (mg/L) para as amostras submetidas a teste de filtração.

Amostra	Turbidez (NTU)	[Ca] (mg/L)
Inicial	3,9	113,34
Após adição de produto	19,5	-
Após processo de filtração 1	0,6	110,58
Após processo de filtração 2	0,6	110,86
Após processo de filtração 3	0,5	112,62

O vinho RSV, utilizado para o ensaio, apresentou uma turbidez inicial de 3,9 NTU que, pela adição de produto aumentou para 19,5 NTU. A turbidez final, depois de cada um dos processos de filtração, foi inferior a 1 NTU e muito próxima para cada um dos ensaios, pelo que se conclui que, tanto a placa de celulose combinada com o filtro de 1,2 μm (processo 2), como a sequência de filtros utilizada no processo 1, apresentam uma eficácia idêntica na remoção dos sólidos em suspensão comparativamente com o processo 3, onde é utilizada a membrana sugerida pelo fornecedor. Por esta razão, e tendo em conta que se trata de uma aproximação mais realista às possibilidades de filtração em armazém, decidiu-se utilizar o processo 2 para filtração do vinho para garrafeira e o 1, como alternativa, para a amostra destinada a análise sensorial, para que pudesse ser avaliada a influência do produto nas propriedades organoléticas do vinho, sem interferência do processo de filtração.

A decisão deste processo estendeu-se ao vinho 10A que apresentou, depois, um comportamento muito distinto. A turbidez final que, tal como referido, deveria ser inferior a 3,5 NTU não desceu nunca abaixo dos 7 NTU tendo, em algumas amostras, apresentado valores de 11 e 12 NTU. Foi realizada, então, a filtração com a membrana de 0,45 μm , com o intuito de reduzir a turbidez para os valores de referência, que também não se mostrou eficaz. Optou-se por descartar os ensaios com este vinho, uma vez que, pela diferença de valores, que não seguiam sequer uma tendência de acordo com as doses adicionadas, não permitiria retirar conclusões concordantes. A razão dada como possibilidade para esta situação foi o facto de se poder tratar de um problema microbiológico e de estarem em suspensão partículas desconhecidas com dimensões inferiores a 0,45 μm cuja análise não se considerou relevante.

4.5 Análise Físico-Química

Depois da agitação, dos 15 dias de repouso e do processo de filtração, já explicado, efetuou-se a análise aos diferentes parâmetros físico-químicos nas garrafas destinadas a tal, sendo que

o principal interesse incide na concentração de Ca, que permite realizar a avaliação da eficácia do produto na remoção deste metal. Na Tabela 15 são apresentados os valores obtidos de [Ca] para as diferentes doses de tratamento aplicadas no vinho RSV.

Tabela 15: [Ca] em mg/L, determinada por EAA à chama, para as amostras controlo e para as amostras submetidas a tratamento com diferentes doses de produto.

Amostra	[Ca] (mg/L)
Controlo	113,34
Controlo Filtrado	110,21
Dose Inferior	114,14
Dose Recomendada	116,48
Dose Superior	110,58

Embora sejam, aparentemente, diferentes uns dos outros, antes de serem retiradas conclusões acerca da eficácia do produto no vinho de teste, os resultados de [Ca] foram submetidos a um método estatístico que permitiu avaliar as diferenças entre eles e considerá-las, ou não, significativas. O método de *Mann-Whitney* permite fazer a comparação de resultados 2 a 2, partindo apenas dos valores das leituras em duplicado para cada uma das amostras. Com um grau de confiança, predefinido, de 95% e comparando o efeito de cada uma das doses com o controlo, concluiu-se que nenhum dos resultados apresentou diferença significativa comparativamente com o desta amostra, à qual não tinha sido adicionado produto (Tabela 16). Tal contecimnento indica que não houve qualquer remoção de Ca durante o tratamento. A comparação entre os valores do controlo com o controlo filtrado, permite concluir que a filtração só por si, tal como esperado, não é capaz de remover o Ca da solução.

Tabela 16: Resultados obtidos pelo teste estatístico de Mann-Whitney com grau de confiança de 95%.

Adaptado de Graphpad Prism 9.

Teste Mann Whitney	Controlo vs. Controlo Filtrado	Controlo vs. Dose Inferior	Controlo vs. Dose Recomendada	Controlo vs. Dose Superior
Valor de P	0,3333	>0,9999	0,6667	0,6667
Valor de P: exato ou aproximado?	Exato	Exato	Exato	Exato
Valor de P: em resumo	Não significativo ($\geq 0,05$)	Não significativo ($\geq 0,05$)	Não significativo ($\geq 0,05$)	Não significativo ($\geq 0,05$)
Diferença significativa? ($P < 0.05$)	Não	Não	Não	Não

Não tendo os resultados apresentado diferenças significativas em relação à amostra controlo, optou-se por não realizar novamente os testes de estabilidade, uma vez que os parâmetros não foram alterados.

O facto do produto não ter sido capaz de remover o Ca dissolvido no vinho por cristalização, pode ser justificado de um ponto de vista cinético ou de um ponto de vista termodinâmico. A

cristalização é um processo explicado por um modelo matemático que, na sua forma mais simples, descreve o crescimento dos cristais com o tempo ($\frac{dL}{dt}$), dependente apenas de uma constante k e do grau de sobressaturação, já mencionado (Δc) - de acordo com a expressão $\frac{dL}{dt} = k \cdot \Delta c$, (Walas, 1988); o grau de sobressaturação poderá eventualmente ser elevado a um coeficiente, obtido por ajuste aos dados experimentais. A não ocorrência de cristalização, indica que os cristais adicionados (CaT micronizado) não sofreram crescimento e que, por isso, algum dos parâmetros, k ou Δc , assumem valores muito reduzidos. A justificação cinética explica que um valor reduzido de k pode dever-se a um tempo de cristalização insuficiente (15 dias de repouso) e/ou a uma temperatura reduzida de armazenamento (15 °C) (Couper, 2005), fazendo com que as condições de repouso não sejam adequadas para uma taxa significativa de crescimento de cristais. Por outro lado, e em termos termodinâmicos, o não crescimento dos cristais pode dever-se ao facto da solução não estar sobressaturada em CaT (contrariamente ao determinado) - não havendo, assim, força impulsora para a ocorrência de cristalização. Neste caso, o erro advirá da determinação do grau de estabilidade do vinho.

Supondo que as classificações de instabilidade fornecidas pelo laboratório produtor se baseiam na proximidade ao ponto de saturação do vinho no referido sal, uma hipótese possível de determinação a partir dos parâmetros requeridos seria através do cálculo do PC e comparação com o respetivo K_{ps} , tabelado ou determinado internamente, sob idênticas condições. Sendo fornecido o valor de pH e a concentração de ácido tartárico, é possível, recorrendo à Figura 7, prever a concentração de ião tartarato disponível sob essas condições; dado o pH dos vinhos em análise, tal corresponde a cerca de 4% da quantidade total de ácido tartárico. Com os valores de concentração de Ca no vinho poderia ser determinado o PC a partir da Equação 5 - o que, por comparação com o K_{ps} , permitiria concluir acerca das condições de sobressaturação. Porém, e conforme já anteriormente referido, o cálculo do PC na sua forma mais exata exige também o contributo dos coeficientes de atividade (γ) dos iões envolvidos (Lasanta & Gómez, 2012; Ribéreau-Gayon et al., 2021); no caso de soluções com comportamentos próximos da idealidade e com frações molares de soluto próximas de 1, γ toma um valor também próximo de 1 (Smith et al., 1949). Porém o vinho é uma solução altamente complexa e o sal em estudo está bastante diluído, pelo que se espera um comportamento não ideal - o que altera o valor do PC calculado. No caso de $\gamma < 1$, o PC real seria então inferior ao calculado, e uma solução pré-classificada como sobressaturada pode inclusive nem satisfazer a condição de saturação. Além disso, sendo o vinho uma solução quimicamente dinâmica, o γ dos diferentes compostos pode sofrer alteração ao longo do tempo pelas reações que ocorrem durante o envelhecimento, ou até ser provocada pela adição de produtos numa fase mais final de produção. Assim sendo, um vinho que se sabe vir a apresentar cristais ao fim de alguns anos em garrafeira, pode não apresentar instabilidade no momento do

seu engarrafamento; por outras palavras, ao enveredar por este tipo de tratamentos, pode estar a tentar-se resolver um problema que “ainda não existe”. O K_{ps} considerado pode, também, não ser aplicável para vinhos do Porto, mas apenas para vinhos tranquilos - para as quais o produto foi idealizado.

Outra explicação possível é que, apesar do método estatístico ter demonstrado a inexistência de diferenças significativas entre os valores obtidos de $[Ca]$ para cada uma das doses em relação ao controlo, o facto de, em algumas das amostras este valor ter sido superior ao controlo, pode significar uma dissolução de CaT ao invés de uma precipitação, como era desejado. Ora, tal facto, está de acordo com a possibilidade da solução não estar saturada em CaT, tendo ainda capacidade para dissolver parte do produto adicionado.

Por outro lado, de acordo com a relação entre o pH e o equilíbrio da dissociação de ácido tartárico, mostrado na Figura 7, é possível concluir que, sob pH próximo de 3,25, a disponibilidade de ião tartarato é muito reduzida quando comparada com a de bitartarato, pelo que haverá uma maior tendência à formação de KHT e não de CaT. De facto, CaT micronizado, ao ser acrescentado à solução, providencia núcleos de cristalização que só crescem quando iões Ca^{2+} e T^{2-} se ligam aos mesmos, na mesma proporção, para garantir que é mantida a neutralidade de carga (de acordo com os princípios gerais de cristalização). No caso de não existir T^{2-} em solução, o Ca^{2+} não se liga ao cristal de CaT e este não cresce, mantendo-se a concentração de cálcio intacta no vinho.

Os restantes parâmetros avaliados podem ser consultados na Tabela 17 e, pela sua análise, pode concluir-se que não houveram, também, alterações significativas, uma vez que todos eles, à exceção da cor e turbidez, se mantiveram idênticos aos da amostra controlo.

Tabela 17: Outros parâmetros avaliados às diferentes amostras de vinho - cor, turbidez (NTU), pH, AT (g/L ácido tartárico), $[Ca]$ (mg/L), teor alcoólico (% V/V), MV (g/L) e [Ácido Tartárico] (g/L).

Amostra	Cor		Turbidez (NTU)	pH	AT (g/L ácido tartárico)	$[Ca]$ (mg/L)	Álcool (%V/V)	MV (g/L)	[Ácido Tartárico] (g/L)
	420 nm	520 nm							
Controlo	0,304	0,136	3,85	3,27	5,08	113,34	19,75	1037,4	1,3
Controlo Filtrado	0,180	0,071	0,58	3,27	5,08	110,21	19,73	1037,0	1,3
Dose Inferior	0,170	0,063	0,40	3,27	5,00	114,14	19,67	1036,9	1,4
Dose Recomendada	0,174	0,064	0,27	3,26	5,00	116,48	19,65	1037,2	1,3
Dose Superior	0,173	0,063	0,37	3,25	5,00	110,58	19,66	1037,2	1,3

Os dois parâmetros que apresentam valores ligeiramente distintos do controlo, são muito influenciados pelo processo de filtração, que terá sido o responsável por essa diminuição. A redução (pouco significativa) do teor em álcool das amostras em relação ao controlo deve-se à exposição do vinho ao ar durante a adição de produto e do processo de filtração, onde poderá ter ocorrido evaporação.

4.5.1 Método do Mini-contacto

Às amostras correspondentes a cada uma das doses de tratamento, foi realizada a avaliação de estabilidade a nível de K, através do método do mini-contacto. Os resultados são obtidos na forma de gráficos, representados na Figura 15 sendo, ainda, devolvido o valor correspondente de Mc .

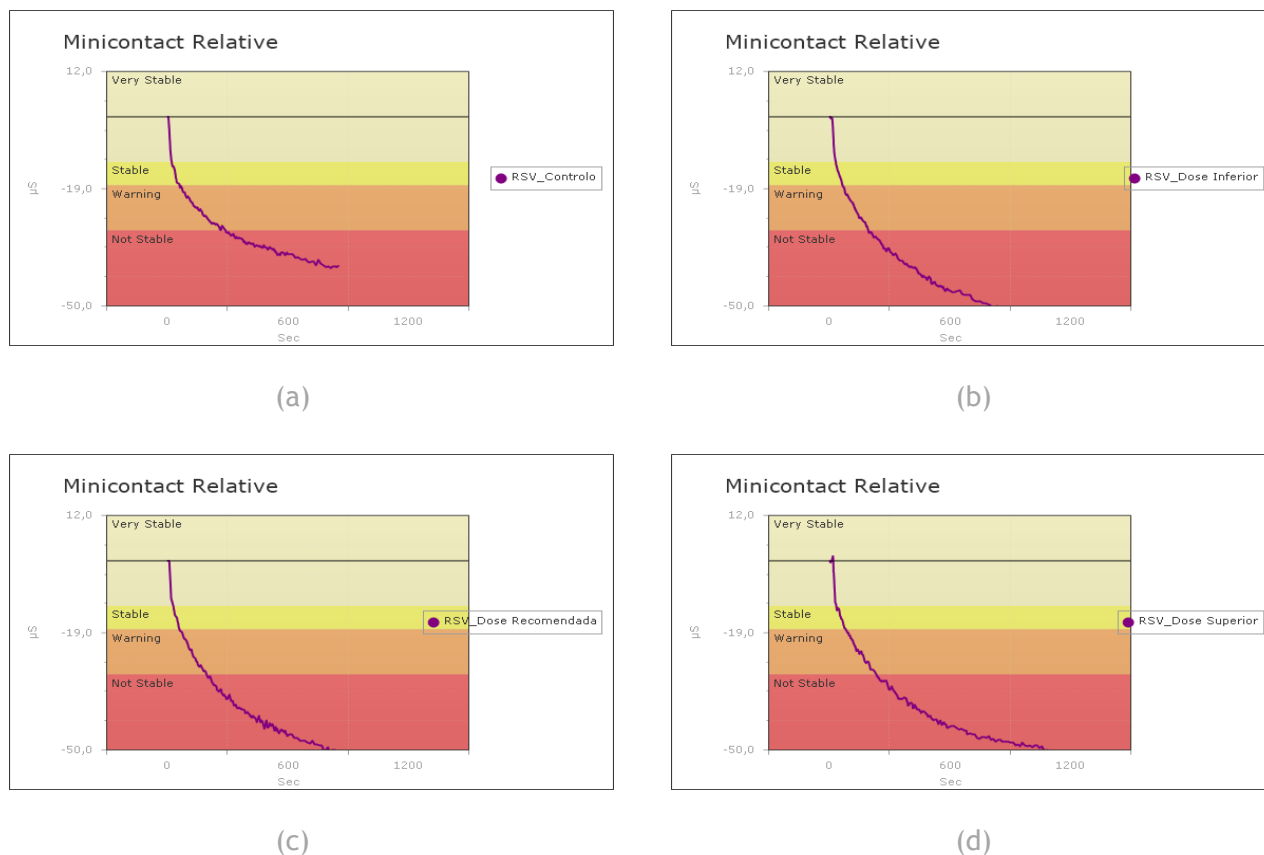


Figura 15: Resultados de estabilidade relativa a KHT, pelo método do mini-contacto, para a amostra (a) controlo e para as amostras tratadas com a dose (b) inferior, (c) recomendada e (d) superior de tratamento.

Segundo os resultados apresentados, é possível concluir que, tal como o controlo, as restantes amostras se mostraram igualmente instáveis relativamente ao K. Posto isto, e de forma a evitar a formação de cristais a longo prazo, nas garrafas de referência adicionou-se um produto de estabilização tartárica já mencionado, o KPA, em diferentes doses sugeridas internamente que, mais uma vez, não podem ser reveladas.

4.6 Análise Sensorial

Os resultados obtidos na prova sensorial encontram-se resumidos no gráfico da Figura 16, resultantes do valor médio das classificações dadas pelos 4 provadores para cada um dos parâmetros em análise.

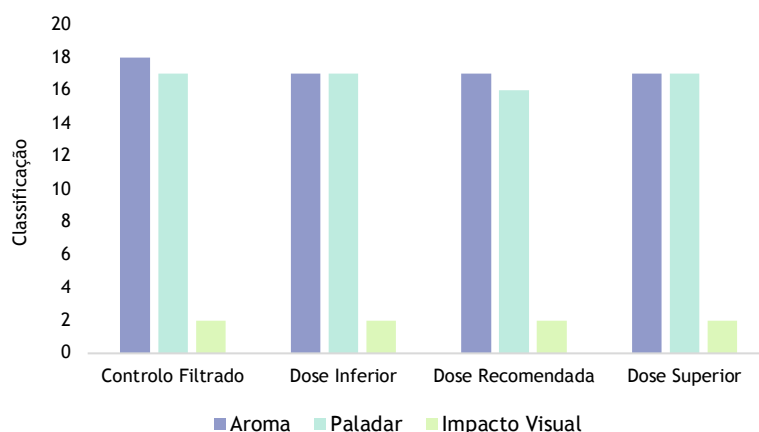


Figura 16: Resultados obtidos na prova sensorial das diferentes amostras em análise.

Pela média das classificações obtidas, em relação à amostra controlo (não submetida a qualquer tratamento), é possível concluir que, a adição de CaT micronizado não teve impacto significativo no aroma e paladar do vinho, uma vez que todas as amostras tratadas foram classificadas com valores acima de 17, assim como o controlo filtrado à qual não foi adicionado produto. Relativamente à análise visual, todas as amostras foram classificadas com 2, correspondente a um ligeiro impacto em relação ao original, incluindo o controlo filtrado, pelo que se conclui que a filtração terá sido a principal responsável por esta alteração. No entanto, o vinho resultante ficou mais brilhante e com uma menor turbidez o que é, também, uma vantagem para o processo, uma vez que o vinho controlo não estaria em condições de engarrafamento por apresentar elevada turbidez.

5 Conclusões

O aparecimento de cristais de CaT em vinhos velhos engarrafados, é um problema que, apesar de não representar perigo para a saúde humana, é visto como uma falha na qualidade. Aparece com maior frequência em vinhos velhos, com maior teor em álcool e açúcar, pelo que os vinhos do Porto, são dos principais afetados. Ao contrário do que acontece com o K, para o qual já são realizadas práticas de estabilização, para o Ca ainda não foi encontrada a solução ótima, pelo que alguns laboratórios se têm focado no desenvolvimento de técnicas ou produtos para remoção deste metal em solução, de forma a reduzir a sua concentração no vinho, assim como a possibilidade de precipitação.

Com o objetivo de estudar a eficiência de um produto de estabilização de cálcio em vinhos do Porto velhos, o CaT micronizado, procedeu-se à sua adição, de acordo com as indicações sugeridas em protocolo em dois vinhos que apresentaram instabilidade. A avaliação de estabilidade foi realizada, internamente, a nível laboratorial e a nível externo, recorrendo a um algoritmo matemático desenvolvido pelo laboratório produtor. Os vinhos selecionados são designados por 10A e RSV e apresentaram instabilidade por ambos os métodos utilizados.

Por não serem totalmente claras em protocolo, estudaram-se as variáveis tempo de agitação e repouso, tendo-se concluído que 1 hora de agitação seguida de 15 dias de repouso levaria à máxima remoção de cálcio, tendo sido a combinação de variáveis aplicada nos seguintes ensaios. De acordo com a dose recomendada sugerida pelos fornecedores, estipulou-se uma dose inferior e uma superior, para cada um dos vinhos em análise, que foram, igualmente, testadas. Depois da adição de produto e do tempo de repouso determinado, procedeu-se à filtração. Nesta fase foram exploradas alternativas ao método sugerido com membrana de 0,45 μm , que levariam, de igual forma à remoção total de produto. Optou-se pela filtração com placa de celulose AF 70, acrescida a um filtro hidrofílico de porosidade 1,2 μm , também de celulose, em todas as amostras, à exceção daquelas que seriam submetidas a prova sensorial. Estas foram filtradas com filtros de celulose de porosidades decrescentes (1-6 μm , 5 μm , 3 μm e 1,2 μm) em duas etapas e à pressão de 0,5 bar (também utilizada no processo anterior). Nesta fase, foram descartados os ensaios do vinho 10A, devido a complicações durante o processo de filtração, por possíveis problemas microbiológicos.

Estando concluída a etapa de filtração no vinho RSV, procedeu-se adição de goma de estabilização de matéria corante e KPA nas amostras para garrafeira e à análise físico-química de cada uma das amostras correspondentes às diferentes doses de tratamento, tendo sido avaliados, entre outros parâmetros, a concentração final de cálcio, que permitiu concluir acerca da eficácia do produto. Recorrendo ao método estatístico de *Mann-Whitney*, foi possível

comparar a concentração final de cálcio obtida pelo tratamento com cada uma das doses, com a concentração da amostra controlo, tendo-se concluído que não houve qualquer remoção de cálcio, visto que os valores foram considerados estatisticamente iguais. Foi ainda realizada a análise sensorial às diferentes amostras, que demonstrou não haver influência nas caraterísticas organoléticas do vinho após o tratamento, mas sim no impacto visual, resultante do processo de filtração. Determinaram-se, ainda, os parâmetros pH, AT, MV, [Ácido tartárico] e teor alcoólico nas diferentes amostras, pelo que se concluiu que não houveram, também, alterações significativas após o tratamento com CaT micronizado.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o produto em teste não será uma possível solução ao problema de instabilidade tartárica relativamente ao tartarato de cálcio em vinhos do Porto, o que pode dever-se à complexidade da matriz em relação aos vinhos DOC, para os quais o produto foi idealizado e testado. Apesar de não ter ocorrido remoção de cálcio, foram colocadas em garrafeira, na empresa, amostras correspondentes a cada uma das doses de tratamento, assim como o controlo, com o intuito de serem observadas ao longo de cerca de 3 anos para avaliar a possível formação de cristais. Sendo a remoção de cálcio nos vinhos um problema cada vez mais urgente na empresa e, apesar desta hipótese não ser a solução, foi possível concluir que o caminho para resolução desta problemática terá de se basear noutros tipos de técnicas, que deverão ser, posteriormente, exploradas.

6 Avaliação do Trabalho Realizado

6.1 Objetivos Realizados

Sendo o objetivo principal deste trabalho, a avaliação da eficácia do produto CaT micronizado na remoção de cálcio em vinhos do Porto, pode considerar-se que foi cumprido, uma vez que este foi testado, assim como estudadas as suas condições de aplicação. Ainda que o produto se tenha mostrado ineficiente, este estudo permitiu, à empresa, concluir, que não se trata de uma abordagem experimental a implementar. Além disso, pela realização dos métodos de avaliação a uma vasta quantidade de vinhos, foi desenvolvida uma base de dados que compila informação relativa a estabilidade de alguns dos vinhos da empresa, que poderá ser útil, eventualmente, na continuação deste caso de estudo.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Além do estudo realizado no âmbito da dissertação, foram adquiridos conhecimentos acerca de procedimentos realizados no processo de produção e engarrafamento do vinho e foi feito acompanhamento do trabalho realizado diariamente no laboratório de qualidade de vinhos.

6.3 Propostas Futuras

Como propostas futuras pode ser sugerida a avaliação de outras técnicas e produtos, já disponíveis no mercado, e ainda o estudo mais profundo da problemática em questão. Para isso poderia começar-se por avaliar se os cristais presentes são, efetivamente de CaT, por espectroscopia IV ou se, eventualmente, se tratam de cristais de um outro sal, nomeadamente KHT, por ter tido uma ineficiente estabilização aquando o engarrafamento. Além disso, de forma a melhorar a determinação do grau de sobressaturação dos vinhos, poderia ser realizada a caraterização do perfil completo de iões de um vinho do Porto, por exemplo do RSV utilizado, e o cálculo da correspondente força iónica. Recorrendo ao modelo de *Debye-Hückel* poderiam ser calculados os coeficientes de atividade, utilizados, depois, para cálculo do PC do vinho. O valor de K_{PS} poderia ser calculado da mesma forma, depois de serem dissolvidas pequenas quantidades de CaT no vinho, até precipitar e ser atingida a saturação e determinados os γ nessas condições. A comparação destes valores permitiria, de forma mais exata, a obtenção de uma classificação real de estabilidade.

6.4 Apreciação Final

Embora não tenha sido descoberta uma forma eficaz de tratamento, pode considerar-se que o objetivo foi concluído. Foi um trabalho muito enriquecedor, não só a nível de objetivos, mas

também em termos de desenvolvimento pessoal. Permitiu relembrar e pôr em prática conhecimentos adquiridos ao longo de todo este percurso de aprendizagem e perceber em que situações é que podem e estão relacionados com assuntos do dia a dia. O facto de conhecer um ambiente empresarial e criar uma rotina de trabalho, fez-me amadurecer muito a nível profissional e perceber as diferenças em relação ao ambiente académico.

- Coulter, A., Holdstock, M., Cowey, G., Simos, C., Smith, P., & Wilkes, E. (2015). Potassium bitartrate crystallisation in wine and its inhibition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 627-641.
- Couper, J. R. (2005). *Chemical process equipment: selection and design*. Gulf professional publishing.
- Crachereau, J., Gabas, N., Blouin, J., Hebrard, B., & Maujean, A. (2001). Tartaric stabilisation of wines by carboxymethylcellulose (CMC). *BULLETIN-OIV*, 74, 151-159.
- Crane, T. (2019). THE WORLD ATLAS OF WINE. *TLS. Times Literary Supplement*(6090-6091), 46-47.
- Curvelo-Garcia, A. S. (1987). O produto de solubilidade do tartarato de cálcio em meios hidroalcoólicos em função dos seus factores determinantes. In (pp. 19-28).
- Curvelo-Garcia, A. S. (1988). *Controlo de Qualidade dos Vinhos* (I. d. V. e. d. Vinho, Ed.).
- Dunsford, P., & Boulton, R. (1981). The kinetics of potassium bitartrate crystallization from table wines. II. Effect of temperature and cultivar. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32(2), 106-110.
- Ecofiltra. (2015). Bitartarato de Potássio - Ficha técnica. In.
- Enartis. (2019). Gestão da Estabilidade Corante dos Vinhos. In.
- Enartis. (2022). Estabilidade Tartárica do Vinho. In.
- Escudier, J., Moutounet, M., Saint-Pierre, B., & Battle, J. (1998). Electrodialyse appliquée à la stabilisation tartrique des vins.
- Regulamento (UE) 2017/1399 da Comissão, (2017). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1399>
- Lista e descrição das fichas do Código de Práticas Enológicas da OIV referidas no artigo 3.o, n.o 2, do Regulamento Delegado (UE) 2019/934 da Comissão, (2019). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2019:409:FULL>
- Ferreira, V., & Bernardes, A. a. M. (2011). Eletrodialise como tratamento de efluentes gerados em processos de revestimentos nanocerâmicos. In.
- Garcia, A. S. C., & Barros, P. F. d. (2015). (PUBLINDÚSTRIA, Ed.).
- Gerbaud, V. (1996). *Détermination de l'état de sursaturation et effet des polysaccharides sur la cristallisation du bitartrate de potassium dans les vins*
- Gerbaud, V., Gabas, N., Blouin, J., & Crachereau, J.-C. (2010). Study of wine tartaric salt stabilization by addition of carboxymethylcellulose (CMC). Comparison with the «protective colloids» effect. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44(3), 135-150.
- Gonçalves, F., Fernandes, C., dos Santos, P. C., & de Pinho, M. N. (2003). Wine tartaric stabilization by electrodialysis and its assessment by the saturation temperature. *Journal of Food Engineering*, 59(2-3), 229-235.
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2008). *Wine production: vine to bottle*. John Wiley & Sons.
- Iland, P. (2004). *Monitoring the winemaking process from grapes to wine techniques and concepts*. Patrick Iland Wine Promotions Pty, Ltd.
- IVDP. (2018). Acidez Total - Vinhos DOP Porto - 2013 / 2018. In.
- IVDP. (2023). *Categorias Especiais - Vinho do Porto*. Retrieved 19, Junho from <https://www.ivdp.pt/pt/vinhos/vinhos-do-porto/categorias-especiais/>
- IVV. (2016, 2018). *Evolução da Área Total de Vinha - Portugal*. Retrieved 22, Março from

- IVV. (2021). *Fórum Anual Vinhos de Portugal 2022 - Exportações*. [https://www.ivv.gov.pt/np4/%7B\\$clientServletPath%7D/?newsId=10133&fileName=EXP ORTA_ES_vf.pdf](https://www.ivv.gov.pt/np4/%7B$clientServletPath%7D/?newsId=10133&fileName=EXP ORTA_ES_vf.pdf)
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications*. Academic press.
- Jackson, R. S. (2022). *Wine tasting: a professional handbook*. Elsevier.
- Lasanta, C., & Gómez, J. (2012). Tartrate stabilization of wines. *Trends in food science & technology*, 28(1), 52-59.
- Lodi-Ribeiro, G. (2017). *História do Vinho no Mundo Romano*. Mauad Editora Ltda.
- Maujean, A., Sausy, L., & Vallee, D. (1985). Détermination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdes protecteurs. *Rev. Fr. Œnol*, 100(4), 39-50.
- McKinnon, A. J., Scollary, G. R., Solomon, D. H., & Williams, P. J. (1994). The mechanism of precipitation of calcium L (+)-tartrate in a model wine solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 82(3), 225-235.
- Mckinnon, A. J., Scollary, G. R., Solomon, D. H., & Williams, P. J. (1995). 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(4), 509-517.
- Mira, H., Leite, P., Silva, J., & Curvelo-Garcia, A. (2004). Resinas permutadoras de iões para estabilização tartárica de vinhos. *6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 26 a 28 de Maio de 2004*, 15-24.
- Moreira, N., & de Pinho, P. G. (2011). Port wine. *Advances in food and nutrition research*, 63, 119-146.
- Moutounet, M., Delphine, B., & Escudier, J. (2010). Efeitos do tratamento de estabilização tartárica dos vinhos tintos através de uma goma de celulose (carboximetilcelulose). *Disponível em www. infowine. com*.
- Mozaz, S. R. g., Sotro, A. G. a., Segovia, J. G., & Azpilicueta, C. A. n. (1999). Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. *Food Research International*, 32(10), 683-689.
- Natolino, A., Tat, L., Gallo, A., Roman, T., & Celotti, E. (2023). Use of potassium polyaspartate on white wines: interaction with proteins and aroma compounds. *Food Research International*, 112768.
- Nunes, M. D. A. (2011). *A electrodialise na estabilidade tartárica dos vinhos. Comparação com o método clássico ISA/UTL*.
- OIV. (2022, 2022). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis - Calcium (Type-II)*. Retrieved 19, Junho from <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-2-cations/calcium-%28type-ii%29>
- Olissipo. (2021). Breve História do Vinho Portugal. 2023(16, Março). <https://www.olissippohotels.com/pt/Corporativo/Noticias.aspx?lang=pt&idnews=106>
- Portugal, W. o. (2021). *About Port Wine*. Retrieved 26, junho from <https://winesofportugal.com/en/portuguese-wines/wine-styles/vinho-do-porto/>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2004). Trattato di enologia II: Chimica del vino. *Stabilizzazione. Trattamenti*, 2nd edn. Edagricole, Bologna.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2021). *Handbook of Enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons.
- Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2004). Estabilidade da matéria corante dos vinhos de regiões de clima quente. I Workshop Internacional de Pesquisa: A produção de vinhos em regiões tropicais,
- Santos, P., Jorge, N. F., Vilela, A., & Cosme, F. (2017). Estabilização tartárica de vinhos: estudo comparativo da eletrodialise e do tratamento pelo frio. *Enovitis*, Jan/Fev/Mar, 30.
- Santos, P. C., PEREIRA, J., Gonçalves, F., SIMÕES, F., & Pinho, M. (2000). Ensaio de estabilização tartárica em vinhos portugueses: Estudo comparativo da electrodiálise e de um método tradicional. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 15(2), 95-108.
- SFE. (2023a). *Family History*. Retrieved 21, Fevereiro from <https://www.symington.com/content/family-history>
- SFE. (2023b). *Symington Today*. Retrieved 21, Fevereiro from <https://www.symington.com/content/symington-today>
- Smith, J. M., Van Ness, H. C., Abbott, M. M., & Swihart, M. T. (1949). *Introduction to chemical engineering thermodynamics*. McGraw-Hill Singapore.
- Strathmann, H. (1986). Synthetic membranes and their preparation. *Synthetic Membranes: Science, Engineering and Applications*, 1-37.
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Tools, I. (2023). *Potentiometric pH measurement*. Retrieved 20, Abril from https://instrumentationtools.com/ph-measurement/?utm_content=cmp-true
- Triulzi, G., Quinterno, G., & Scotti, B. (2022). A instabilidade do tartarato de cálcio In: Associação Portuguesa de Enologia e Viticultura.
- Turiventos. (2015). *Regiões Vinícolas de Portugal*. <https://turiventos-turismoeventos.blogs.sapo.pt/regioes-vincolas-de-portugal-20156>
- Vernhet, A. (2019). Chapter 16 - Red Wine Clarification and Stabilization. In A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 237-251). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00016-5>
- Walas, S. M. (1988). *Chemical Process Equipment: Selection and Design*. Butterworth-Heinemann. <https://books.google.pt/books?id=8uNEPwAACAAJ>
- WineTeller. (2002). *Castas*. Retrieved 16, Março from <https://wineteller.pt/castadovinho>
- Wu, P., He, S., Luo, B., & Hou, X. (2009). Flame furnace atomic absorption spectrometry: a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(5), 411-437.
- Youssef El Rayess, S. A.-A., Ziad Rizk, Chantal Ghanem, Nancy Nehme. (2016). Clarification and Stabilization of Wines using Membrane Processes. In *Wine Tartaric Stabilization*.
- Zoecklein, B. (1988). A review of potassium bitartrate stabilization of wines. *Publication-Virginia Cooperative Extension Service (USA)*.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). Tartrates and Instabilities. *Wine Analysis and Production*, 228-241.

Apêndice A - Validação da Reta de Calibração de EAA à Chama

Conforme descrito na secção de materiais e métodos, relativo à metodologia de determinação da concentração de cálcio, antes da realização da leitura das amostras é necessária a construção da reta de calibração que permite relacionar a absorvância lida pelo espectrofotómetro e a respetiva concentração de cálcio.

Pela leitura dos padrões P de concentrações conhecidas, obtiveram-se as absorvâncias correspondentes. Os valores encontram-se na Tabela A1 e a respetiva reta de calibração obtida, na Figura A1.

Tabela A1: [Ca] (mg/L) e respetivos valores de absorvância lidos a 422,7 nm.

Padrões	
[Ca] mg/L	Abs
1,00	0,0349
2,00	0,0688
3,00	0,1023
4,00	0,1366
5,00	0,1697

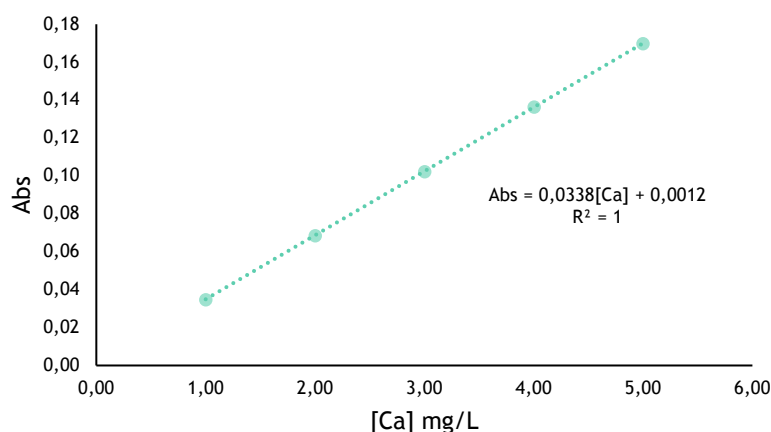


Figura A1: Reta de calibração para EAA à chama.

Para verificar a fiabilidade da reta de calibração é então necessário proceder à sua validação, através de parâmetros estipulados na literatura. A reta deve conter pelo menos 5 pontos (n) e a gama de concentrações (γ) deve diferir, no mínimo, num fator de 10. O desvio padrão relativo (s_a/a %) deve ser inferior a 5% e a ordenada na origem deve conter o zero, para

isso, $b-s_b$ e $b+s_b$, devem ser, respetivamente, inferior e superior a zero. Além disso, o coeficiente de correlação ao quadrado (R^2), resultante da regressão linear, deve ser superior a 0,995.

A reta de calibração obtida para o ensaio é linear e do tipo $Abs = (a \pm ts_a)[Ca] + (b \pm ts_b)$, correspondendo a e b , respetivamente, aos valores de declive e ordenada na origem e ts_a e ts_b aos intervalos de confiança associados, calculados recorrendo à distribuição de t -Student. Na Tabela A2 são apresentados os valores calculados para os parâmetros de t -Student num intervalo de confiança de 95%.

Tabela A2: Parâmetros t -Student calculados para um intervalo de confiança de 95%.

Parâmetros t -Student	
Graus de Liberdade (n-2)	3
t -Student	2,3533
$S_{y/x}$	0,0002966
s_a	0,0000938
s_b	0,0000440
$t s_a$	0,0002
$t s_b$	0,0001

Após construção do gráfico e cálculo dos parâmetros acima referidos, obteve-se a reta de calibração da Equação A1.

$$Abs = (0,0338 \pm 0,0002) [Ca] + (0,0012 \pm 0,0001) \quad (\text{Eq. A1})$$

Depois de calculados os diferentes parâmetros de validação da reta, foi possível concluir acerca da sua validade. Na Tabela A3 apresentam-se todos esses parâmetros, assim como os respetivos valores de referência.

Tabela A3: Parâmetros de validade da reta de calibração.

Parâmetro	Valor obtido	Referência	Validade*
n	5	≥ 5	✓
γ^*	5	≥ 10	x
s_a/a (%)	0,2778 %	<5 %	✓
$b-s_b$	0,0011	<0	x
$b+s_b$	0,0012	>0	✓
R^2	1,000	>0.995	✓

* ✓ - valor válido relativamente à referência; x - valor inválido relativamente à referência.

Pela análise da tabela de validade de parâmetros, podemos concluir que a reta de calibração não é totalmente válida, uma vez que não cumpre todos os requisitos de validade; no entanto, os valores foram considerados para o estudo, por se tratar da reta sugerida e utilizada nas análises diárias do laboratório e para o qual o *software* de EAA à chama se encontra programado.

Apêndice B - Folha de Prova Utilizada para Análise Sensorial

Análise Sensorial

Ensaio Estabilização do Cálcio em Vinho do Porto

Identificação	Aroma (0-20)	Paladar (0-20)	Impacto Visual (1-3)	Aprovação	Observações
	0 - Mínimo 20 - Máximo	0 - Mínimo 20 - Máximo	1 - Sem impacto 2 - Ligeiro impacto 3 - Impacto Excessivo	Aprovado/ Não Aprovado	
T					
EC10_1					
EC10_2					
EC10_3					
EC10_4					