

CTeSP em Viticultura e Enologia

Estabilização e Conservação de Vinhos



ESAV
2019 / 20

Fernando J. Gonçalves

CENTRO **20**
20

PORTUGAL
2020

 **UNIÃO EUROPEIA**
Fundo Social Europeu

NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DE UM RELATÓRIO

- Título: Deve ser breve e conciso.
- Resumo: Deve conter o essencial do trabalho, nomeadamente os resultados experimentais mais relevantes.
- Introdução: Uma breve iniciação ao problema em estudo, fazendo uso se possível a referências bibliográficas, onde se assinala o interesse da experiência, a sua importância, a sua utilidade, o seu fundamento. No fundamento dos métodos deverão ser referidas as reações que ocorrem e que nos permitem identificar as substâncias a pesquisar.
- Parte experimental: Contém a indicação e descrição respetiva dos aparelhos ou da montagem usada, dos reagentes utilizados e do método experimental seguido. explicar de forma breve as observações mais importantes. Apresentar os cálculos necessários para a preparação de soluções.
-
- Resultados: são descritos os resultados das experiências, preferencialmente sob a forma de gráfico e /ou tabelas.
- Discussão/Conclusões: Juntamente com os resultados, constitui a parte mais importante de todo o relatório. Faz-se a análise dos valores mais relevantes, comparando-os com outras metodologias semelhantes. Comentar a precisão e exatidão sempre que possível. Apontar possíveis causas de erros.
- Bibliografia: Contém a lista dos livros, artigos ou sítios da internet citados ao longo de todo o trabalho.

1. ACIDEZ VOLÁTIL TOTAL

1.1 **Definição:** A acidez volátil é constituída pelos ácidos orgânicos da série gorda $C_nH_{2n}O_2$, quer no estado livre quer na forma salificada. O ácido acético é o mais abundante nos vinhos, acompanhado por pequenas quantidades dos ácidos butírico e propiónico.

1.2 **Princípio do método:** A separação dos ácidos voláteis é feita por arrastamento de vapor de água, seguida de destilação e condensação. A titulação é efetuada usando fenolftaleína como indicador. Devem-se tomar as precauções necessárias para evitar a presença de gás carbónico no destilado.

(Nota: A determinação deve ser efectuada o mais rápido possível após a abertura da garrafa.)

1.3 **Reagentes e Aparelhos:**

- Água destilada isenta de CO_2 .
- Solução alcoólica de fenolftaleína (1g/100mL) : Num balão de diluição de 100mL, dissolver 1g de fenolftaleína em quantidade suficiente de etanol 95% e perfazer o volume.
- Solução de NaOH a 0.1M.
- Cozimento de amido (5g/L): A 5g de amido solúvel adicionar uma pequena quantidade de água fria, de modo a obter uma pasta fluída, que se adiciona a 1L de água em ebulição. Manter a ebulição durante 5 min. O cozimento de amido é utilizado frio, e deve ser límpido.
- Solução de H_2SO_4 25% (v/v).
- Solução de iodo 5% (m/v).
- Aparelho de destilação, Cazenave-Ferré. Este aparelho garante que o vapor produzido está isento de CO_2 , e que 99.5% do ácido acético do vinho é arrastado.

1.4 Procedimento Experimental:

1º Num erlenmeyer colocar 300 mL de água destilada.

2º No recipiente de destilação (tubo de sellier), colocar 20 mL de vinho e 0,5g de ácido tartárico .

3º Tapar a saída do ar.

4º Iniciar a destilação (abrir a torneira da água fria para se dar a condensação); quando a água do erlenmeyer começar a ferver destapar a saída de ar. Terminar a destilação quando se recolher 100 mL de destilado.

5º Adicionar 3-4 gotas de fenolftaleína.

6º Titular com uma solução de NaOH 0.1 N (V_{NaOH}) até ao aparecimento da coloração rosa.

1.5 Resultados:

A acidez volátil corrigida é expressa em gramas de ácido acético por litro, e é obtida pela seguinte expressão: $\text{ac. volátil} = 0.3 \times V_{\text{NaOH}}$. O resultado é dado com duas casas decimais.

2. ACIDEZ TOTAL

2.1 Definição: A acidez total é o conjunto de todos os ácidos existentes no vinho, quer destilem (ácidos voláteis) ou não (ácidos fixos) e que são tituláveis quando se leva o pH do vinho a 7; ácido carbónico e o anidrido sulfuroso livre e combinado não estão compreendidos na acidez total.

2.2 Princípio do método: Titulação dos ácidos por uma solução alcalina, usando uma solução de azul de bromotimol como indicador.

2.3 Reagentes:

- Água destilada.
- Solução de azul de bromotimol (ABM): 4g de ABM são dissolvidos em 200mL de álcool neutro; juntam-se 200mL de água e depois cerca de 7,5mL de NaOH, até se obter uma coloração azul-esverdeada. Completa-se até aos 1000mL com água.
- Solução de NaOH 0,1N.

2.4 Procedimento Experimental:

1º Num erlenmeyer juntar:

- 10 mL de vinho, medidos com pipeta de precisão.
- 25 mL de água destilada. (no caso de amostras pouco coradas podem não ser adicionados)
- 1 mL de azul de bromotimol.

2º Titular com uma solução de NaOH 0,1N ($V_{(\text{NaOH})}$). O ponto de viragem é marcado pela mudança de cor para azul esverdeado.

2.5 Resultados:

A acidez total é expressa em gramas de ácido tartárico por litro de bebida. O valor é obtido pela expressão: $\text{ac. total} = V_{(\text{NaOH})} \times 0,75$ e é dado com duas casas decimais.

3. ACIDEZ REAL ou pH

3.1 Definição: O pH de uma solução define-se como sendo o logaritmo da concentração hidrogeniónica. Matematicamente: $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$.

3.2 Princípio do método: Determinação da diferença de potencial entre dois eléctrodos mergulhados numa solução (vinho ou mosto). Um dos eléctrodos tem um potencial que é função definida do pH da solução, o outro tem um potencial fixo e conhecido - eléctrodo de referência.

3.3 Aparelhos e Reagentes:

- Soluções tampão de pH's 2,56 e 3.99.
- Potenciómetro.

3.4 Procedimento Experimental:

1º Calibrar o potenciómetro com as duas soluções tampão.

2º Mergulhar o eléctrodo na amostra (vinho ou mosto), e ler o valor de pH.

3.5 Resultados: o pH é obtido por leitura directa, e é expresso com duas casas decimais.



4. SULFUROSO LIVRE, COMBINADO E TOTAL (Método Ripper)

4.1 Definição: Chama-se anidrido sulfuroso livre dos mostos, ou vinhos, ao sulfuroso que se encontra no estado SO_2 ou nos estados H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^{2-} . Sulfuroso total é a soma do sulfuroso livre mais o sulfuroso combinado.

4.2 Princípio do método: A determinação da fracção livre baseia-se na titulação iodométrica directa em meio ácido, utilizando solução de amido como indicador. A determinação do SO_2 combinado baseia-se na titulação iodométrica em meio ácido após dupla hidrólise alcalina e oxidação do SO_2 livre na primeira etapa.

(NOTA: Esta determinação deve ser efectuada o mais rápido possível após a abertura da garrafa.)

4.3 Reagentes: Cozimento de amido a 5g/L; Solução de H_2SO_4 a 10% (v/v); Solução de iodo a 0,05N; NaOH 4N (ou 16% m/v)

4.4 Procedimento Experimental:

1. Num erlenmeyer de 500 mL, colocar 50 mL de vinho, 3 mL de solução de ácido sulfúrico (10% v/v) e 5 mL de cozimento de amido.
2. Titular com solução de iodo (0,05N) até ao aparecimento persistente de cor azul durante 10-15s. Registrar o volume (v_1)
3. Ao erlenmeyer adicionar 8 mL de hidróxido de sódio 4N, agitar uma vez e deixar em contacto durante 5min.
4. Juntar 10 mL de H_2SO_4 (10% v/v) e agitar.
5. Titular imediatamente com a solução de iodo. Registrar o volume (v_2)
6. Adicionar 20 mL de NaOH 4N, agitar uma vez e deixar em contacto durante 5min.
7. Adicionar 100 mL de água destilada fria e agitar.
8. Juntar 30 mL de H_2SO_4 (10% v/v) e agitar.
9. Titular imediatamente com a solução de iodo. Registrar o volume (v_3)

4.5 Resultados:

$$\text{SO}_2 \text{ livre} = 32 \times V_1 \text{ (mg/L)}$$

$$\text{SO}_2 \text{ combinado} = 32 \times (V_2 + V_3) \text{ (mg/L)}$$

$$\text{SO}_2 \text{ total} = 32 \times (V_1 + V_2 + V_3) \text{ (mg/L)}$$

5. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO

5.1 Definição: Teor alcoólico ou grau alcoólico, são designações para definir a quantidade de álcool contida numa bebida (neste caso vinho ou mosto). Grau alcoólico é o volume de etanol puro em 100 volumes, medidos à mesma temperatura (aparentemente 20°C).

5.2 Princípio do método: Determinação da temperatura de ebulição do vinho, intermédia entre a da água e a do etanol e directamente relacionada e dependente do respectivo teor alcoólico em volume.

5.3 Equipamento: ebuliómetro; régua ou círculo ebuliométrico.

5.4 Procedimento Experimental:

1. Encher o reservatório do ebuliómetro com água, de modo a que a água não toque no termómetro.
2. Ligar a água de refrigeração e o aquecimento, para determinar a temperatura de ebulição da água.
3. Esvaziar o reservatório.
4. Acertar o zero na régua ebuliométrica.
5. Encher o reservatório do ebuliómetro com vinho, de modo a que a ponta do termómetro fique imerso no vinho.
6. Determinar a percentagem de álcool no vinho com recurso à régua ebuliométrica.

6. ÍNDICE DE POLIFENÓIS TOTAIS (IPT)

6.1 Princípio do método: Os vinhos tintos absorvem consideravelmente radiação UV, com um máximo de absorvência 280, devido essencialmente à presença de grupos benzénicos, característicos dos compostos fenólicos.

O método também é aplicável a vinhos brancos, mas para diluições mais pequenas pode ocorrer a interferência de substâncias não fenólicas.

6.2 Material: células de quartzo de 1cm e espectrofotómetro de UV-Vis

6.3 Procedimento experimental:

- Diluir o vinho 1:100, e ler a absorvência a 280 nm, em células de quartzo de 1cm.

6.4 Resultados

$$\text{IPT} = \text{Abs } 280 \times 100$$

7. CINZAS

7.1. MATERIAL:

- Cadinho de porcelana (ou platina) de 50 ml
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Banho-maria
- Exsicador
- Balança analítica
- Mufla
- Bico de Bunsen.

7.2. PROCEDIMENTO:

- Aquecer o cadinho a 550°C durante 10 minutos, arrefecer no exsicador e pesar (m1).
- Pipetar 25 ml da amostra no cadinho, evaporar até securo no banho-maria fervente (tomar cuidado para não deixar espirrar a amostra).
- Queimar em Bico de Bunsen
- Levar o cadinho à mufla a 550°C ± 25°C, até que as cinzas fiquem brancas.
- Arrefecer no exsicador e pesar (m2)

7.3. CÁLCULO

As cinzas são expressas em gramas por litro de amostra pela fórmula:

$$\text{Cinzas (g/L)} = 40 \times (m_2 - m_1)$$

8. DETERMINAÇÃO DO EXTRATO SECO TOTAL

8.1. Definição: Extracto seco total é definido como sendo o conjunto de todas as substâncias que, em determinadas condições físicas não se volatilizam.

8.2. Método Indirecto:

Método Tabarié-Girard (método oficial O.I.V. / português)

Procedimento experimental:

O extracto seco total é calculado indirectamente a partir do valor da densidade do resíduo seco sem álcool (fórmula de Tabarié):

$$D_r = d_v - d_a + 1.0000$$

Onde:

D_r = densidade relativa do resíduo sem álcool a 20°C

d_v = densidade do vinho a 20°C

(deve ser corrigida em função da acidez volátil: $d - 0,0000086 \times a_v$
miliequivalentes/L)

d_a = densidade da mistura hidroalcoólica, com a mesma percentagem de etanol do vinho a 20°C (tabela 1 da NP 753)

ou

$$D_r = 1,0018 (D_v - D_a) + 1,00$$

D_v : massa volúmica do vinho a 20°C

D_a : massa volúmica da mistura hidroalcoólica, com a mesma percentagem de etanol do vinho a 20°C

Resultados:

O teor em extracto seco determina-se pela tabela seguinte (NP2222):

Densidade até a segunda casa decimal	Terceira casa decimal da densidade									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Gramas de extrato contidas em 1 litro									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109,9	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135,0	137,6	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
1,06	155,9	158,6	161,2	163,8	166,4	169,9	171,6	174,3	176,9	179,5
1,07	182,1	184,8	187,4	190,0	192,6	195,2	197,8	200,5	203,1	205,8
1,08	208,4	211,0	213,6	216,2	218,9	221,5	224,1	226,8	229,4	232,6
1,09	234,7	237,3	239,9	242,5	245,2	247,8	250,4	253,1	255,7	258,4
1,10	261,0	263,6	266,3	268,9	271,5	274,2	276,8	279,5	282,1	284,8
1,11	287,4	290,0	292,7	295,3	298,0	300,6	303,3	305,9	308,6	311,2
1,12	313,9	316,5	319,2	321,8	324,5	327,1	329,8	332,4	335,1	337,8
1,13	340,4	343,0	345,7	348,3	351,0	353,7	356,3	359,0	361,6	364,3
1,14	366,9	369,6	372,3	375,0	377,6	380,3	382,9	385,6	388,3	390,9
1,15	393,6	396,2	398,9	401,6	404,3	406,9	409,6	412,3	415,0	417,6
1,16	420,3	423,0	425,7	428,3	431,0	433,7	436,4	439,0	441,7	444,4
1,17	447,1	449,8	452,4	455,2	457,8	460,5	463,2	465,9	468,6	471,3
1,18	473,9	476,6	479,3	482,0	484,4	487,4	490,1	492,8	495,5	498,2
1,19	500,9	503,5	506,2	508,9	511,6	514,3	517,0	519,7	522,4	525,1
1,20	527,8	530,5	533,2	535,9	538,6	541,3	544,0	546,7	549,4	551,2
TABELA DE AJUSTE										
4ª decimal da densidade	Gramas de extrato 1 litro	4ª decimal da densidade	Gramas de extrato 1 litro	4ª decimal da densidade	Gramas de extrato 1 litro					
1	0,3	4	1,0	7	1,8					
2	0,5	5	1,3	8	2,1					
3	0,8	6	1,6	9	2,3					

8.3. Método Directo:

Material: - Cápsula cilíndrica de fundo chato de 70 mm de diâmetro e 20 mm de altura, Estufa, Banho-maria, Exsicador, Balança, Pipeta volumétrica de 25 mL.

Procedimento experimental:

- Levar uma cápsula à estufa a 105°C, arrefecer no exsicador e pesar (m1).
- Pipetar 25 mL da amostra para a cápsula.
- Evaporar lentamente em banho-maria a 100°C durante 3 horas
- Colocar na estufa a 105°C por 30 minutos.
- Arrefecer no exsicador e pesar (m2)

8.3. Cálculo:

Extrato seco (g/L) = 40 x (m2-m1)

Nota: No caso de amostras com alto teor de extrato, pode-se efetuar diluição da amostra.

9.ACOMPANHAMENTO DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA: CROMATOGRAFIA EM PAPEL

9.1 Introdução

A fermentação maloláctica (FML) consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico e é levado a cabo pelas bactérias lácticas. Pode ocorrer durante a fermentação alcoólica ou posteriormente. A FML realiza-se para melhorar a qualidade dos vinhos, sobretudo em vinhos tintos e vinhos ácidos. A FML produz uma diminuição da acidez e modificação de sabores e aromas. Caso não se controle a sua ocorrência da FML, pode dar-se após o engarrafamento, originando a formação de gás tornando o vinho desagradável.

A cromatografia em papel é uma técnica que permite avaliar se a FML já decorreu, pela determinação da presença/ausência do ácido málico e do láctico.

O ácido tartárico ($R_f = 0,1$ a $0,2$), o ácido málico ($R_f = 0,4$ a $0,6$) e os ácidos láctico + succínico ($R_f = 0,8$ a $0,9$) são separados por cromatografia de papel. Em presença de azul de bromofenol, os ácidos são revelados por manchas amarelas sobre fundo azul. Por comparação visual da intensidade e da diminuição da mancha com os correspondentes a padrões de teor conhecido é possível avaliar o teor em ácido málico da amostra.

9.2 Reagentes Material e Equipamento

- Solução de bromofenol em n-butanol: 1 L de l-butanol + 1g de azul de bromofenol

- Solução aquosa ácido acético a 50%: 500 mL de ácido acético + 500 mL água destilada

- Soluções padrão de ácido D-L-málico:

1g, 2g e 3 g/L em etanol a 15% (v/v) + 5 g/L de formol (ou cristais de timol).

Estas soluções devem ser conservadas em frigorífico.

- solvente revelador: 50 mL da solução de bromofenol e 20 mL da solução de ácido acético

- Papel de cromatografia Whatman nº 1

- Campânula de vidro para cromatografia (c= 18,-19 cm; h = 25 cm)

- Tina de vidro para cromatografia (c = 15 cm; h =6 cm)

15.3 Procedimento Experimental

Preparação da câmara de cromatografia:

Colocar dentro da tina o solvente revelador e tapar com a campânula.

Preparação do papel de cromatografia

Num retângulo de papel Whatman nº 1 (h = 23 cm; l=25 a 40 cm), traçar com um lápis uma reta paralela ao lado a 4 cm do fundo. Sobre esta reta marcar a lápis, pontos espaçados de 3 cm, indicando os locais onde se depositará com a ajuda da micropipeta de 2 μL a amostra a analisar e as soluções padrão. Em amostras contendo pequenas quantidades de ácido málico, a sensibilidade pode ser aumentada com a deposição de 5 μL (figura 2).

Após secagem das soluções depositadas, o papel é enrolado na forma cilíndrica e mantido nessa posição através de 2 agrafes de alumínio, tendo o cuidado de não permitir que as extremidades da folha de papel fiquem em contacto.

Migração e revelação

Colocar o cilindro de papel na câmara de cromatografia, fechar e deixar o solvente revelador subir por capilaridade. Quando a frente do solvente chegar a cerca de 2 cm da parte superior (cerca de 7 horas) retira-se e seca-se o papel pendurado em local arejado e isento de vapores. A secagem faz com que o papel passe do amarelo ao verde e depois a azul e as manchas amarelas correspondentes aos ácidos aparecem na folha.

Os ácidos separam-se pela seguinte ordem ascendente: ácido tartárico, ácido málico e ácido láctico + succínico (figura 2).

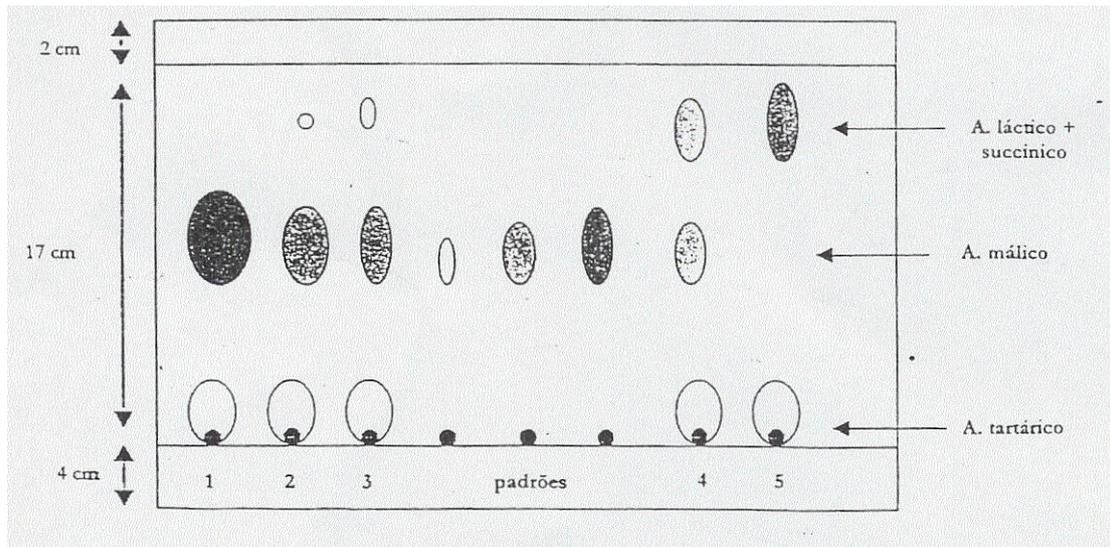


Figura 2: representação esquemática de uma cromatografia de papel de 5 amostras e 3 padrões.
 Legenda: 1-Mosto; 2-Fermentação alcoólica 3-início da FML; 4-FML a meio; 5-FML completa

9.4 Resultados

A avaliação semi-quantitativa do ácido málico é feita, por comparação visual da intensidade e dimensão da mancha da amostra com as correspondentes às soluções padrão.

O resultado é expresso em g/L com uma reprodutibilidade de $\pm 0,5$ g/L.

Bibliografia:

- Amerine, M.; (1976) Análisis de vinos y mostos
- Curvelo Garcia A.S.; (1988) Controlo de qualidade dos vinhos. Instituto da vinha e do vinho.
- Dias Cardoso, António (2007). O vinho da uva à garrafa. Âncora Editora, Lisboa:
- Jackson, R. S.; (1994) Wine Science: Principles and Applications. Academic Press.
- Navarre, C.; (1997) Enologia: Técnicas de produção do vinho. Publicações Europa-América.
- Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud, P. (1977) Traité d'Oenologie: Sciences et techniques du Vin. Dunod (ed.). 4 volumes.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex.
- Tullio de rosa (1988). Tecnologia del vino tinto. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury, F.S.; (1994) Wine analysis and production, Chapman & Hall.