



Aplicação de Ultrassons ao processo produtivo de vinho

FRANCISCA BAIA-BAIA MOREIRA DE SOUSA ARAÚJO

novembro de 2019



Aplicação de Ultrassons ao processo produtivo de vinho

Francisca Baia-Baia Moreira de Sousa Araújo

Tese para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química-Qualidade

Orientadores

Eng.º Rui Oliveira

Eng.ª Cristina Morais

2019

Agradecimentos

Gostaria de dirigir os meus sinceros agradecimentos a todos os técnicos e profissionais do CIETI (Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial) bem como aos laboratórios do ISEP, que me acolheram durante o período de estágio, e que, a todos os níveis, muitos ensinamentos me transmitiram. Um especial agradecimento por me terem dado todo o apoio necessário, durante o período de estágio, e por porem todo o seu conhecimento ao meu dispor.

Aos meus orientadores, Eng.^a Cristina Morais e Eng.^o Rui Oliveira, e ainda ao Eng.^o António Ribeiro, gostaria de agradecer todo o apoio e toda a disponibilidade demonstrada durante a realização do Estágio.

Um agradecimento especial à Eng.^a Aurora, por toda a ajuda prestada e por todos os conselhos que me deu ao longo da minha vida académica.

A todos os meus colegas de curso, e a todos os meus amigos um enorme obrigada por todos os momentos passados, e também pelas grandes amizades que se criaram ao longo destes seis anos no ISEP.

Agradeço também à Associação de Estudantes do ISEP por me ter acolhido no seu seio, pelas amizades criadas, enquanto dirigente associativa da mesma, e pelas longas horas de estudo e escrita dentro daquelas quatro paredes.

Agradeço ainda a todos os meus amigos de longa data, por sempre me apoiarem e estarem sempre presentes nos bons e maus momentos. Deixo um agradecimento especial à Joana Teixeira, à Patrícia Marques, à Raquel Vinhas, à Sara Gonçalves, à Irene Cascão, à Carla Gonçalves, à Catarina Ferreira e à Daniela Cunha por me ouvirem, me aconselharem e nunca me deixarem desistir. Vocês sempre me deram força para continuar.

Um agradecimento final, e muito especial, à minha família e ao meu namorado que sempre demonstraram um apoio incondicional tremendo em todos os momentos da minha vida pessoal e académica.

Sentimentos antagónicos emanam no término desta etapa: é altura de abandonar um local onde raízes e boas recordações foram criadas. Levo comigo uma licenciatura e um mestrado, que, independentemente da sua utilidade no futuro, me proporcionaram seis excelentes anos. A todos vós, intervenientes neste processo, um saudoso abraço!

Resumo

Vinho (do latim *vīnum*, que tanto pode significar "vinho" como "videira") é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo de uva.

Na União Europeia, o vinho é legalmente definido como sendo um produto obtido através da fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas, ou de mostos. A constituição química das uvas permite que estas fermentem, sem que lhes sejam adicionados açúcares, ácidos, enzimas ou outros nutrientes. A fermentação das uvas é feita por vários tipos de leveduras, que consomem os açúcares presentes na fruta, transformando-os em álcool. Durante a sua produção, e em diferentes etapas, o vinho pode sofrer diversos tratamentos, consoante o que se pretende obter. Alguns desses tratamentos são a extração de cor, a desgaseificação ou ainda o seu envelhecimento.

O uso dos ultrassons é um campo de pesquisa que se encontra em crescimento, e que, cada vez mais, está a ser implementado na indústria alimentar, tanto para análise como para modificação de produtos da mesma. Os ultrassons são ondas acústicas inaudíveis, que cobrem uma faixa de frequências desde os 20 kHz até aos 2 MHz. Este vasto campo de frequências oferece uma grande variedade de aplicações cuja exploração constitui a base do desenvolvimento das aplicações de ultrassom.

Assim, este trabalho, desenvolvido ao longo de dezasseis meses, pretende analisar a viabilidade do uso de técnicas de ultrassons associadas à desgaseificação do vinho bem como a sua influência nas leveduras durante a fermentação, servindo também para dar resposta às questões atuais da indústria enológica. Como tal, os principais objetivos são:

- estudo da influência do uso de ultrassons durante o processo de fermentação, como possível substituição de processos químicos e físicos;
- avaliação do melhor tempo de aplicação dos ultrassons nas amostras, para se obter uma maior desgaseificação;
- otimização da temperatura;
- otimização do volume de amostra usada nos ensaios de ultrassons.

Como referido anteriormente, com o objetivo de responder às exigências do mercado, a TRATIVI, empresa Portuguesa especializada em tecnologia vinícola, decidiu iniciar um estudo associado à aplicação de ultrassons na produção dos vinhos, com a finalidade de verificar se seria possível melhorar algumas partes do processo produtivo.

Como tal, o estudo baseou-se na avaliação da utilização de ultrassons como um meio para a desgaseificação do vinho e ainda na avaliação da sua influência nas leveduras, durante a fermentação. Foram conduzidos vários testes, com diferentes tempos de aplicação, e sempre com a mesma frequência (20 kHz).

Em primeiro lugar, foi realizada uma análise ao vinho em causa (vinho espumante), de forma a conhecer as suas características para este estudo. Começando por responder aos desafios colocados pela empresa, procurou-se estudar a influência dos ultrassons no decorrer de uma fermentação. Para tal, foram realizadas fermentações, com uma matriz, a qual designou-se como Matriz Branca. Numa segunda abordagem estudou-se o efeito dos ultrassons na desgaseificação do vinho, para diferentes temperaturas iniciais da amostra, usando um volume constante de 50 mL. Finalmente analisou-se o efeito dos ultrassons, na desgaseificação do vinho, em função do volume da amostra. Estes ensaios foram realizados para quatro volumes (25, 50, 75 e 100 mL). Para cada um destes volumes foram utilizadas cinco temperaturas iniciais diferentes (10, 14, 16, 18 e 20 graus Celsius). O nível de desgaseificação está associado, em todos os casos, à diferença entre os valores inicial e final de CO₂ nas amostras.

Após a realização do estudo em questão e analisando os resultados obtidos, conclui-se que:

- efetivamente, os ultrassons apresentam-se como destrutivos para a levedura, provocando a autólise desta;
- os valores obtidos de percentagens de redução, do início para o final da fermentação (30%), são promissores e revelam que é possível de se acelerar o processo de *bâtonnage*;
- as amostras apresentavam uma maior estabilidade usando-se um tempo de aplicação de três minutos;
- o ponto máximo de desgaseificação ocorre quase sempre próximo de uma temperatura inicial de 16°C;
- à medida que se aumenta o volume de amostra, a desgaseificação diminui.

Palavras-Chave: Bâtonnage, Desgaseificação, Vinho, Ultrassons

Abstract

Wine (from Latin *vīnum*, which can mean both "wine" and "vine") is generally an alcoholic beverage produced by fermentation of grape juice.

In the European Union, wine is legally defined as a product obtained by the partial or total fermentation of fresh whole or crushed grapes or must. The chemical constitution of grapes allows them to ferment without adding sugars, acids, enzymes or other nutrients. The fermentation of grapes is made by various types of yeast, which consume the sugars present in the fruit, turning them into alcohol. During its production, and in different stages, the wine can undergo various treatments, depending on what is intended. Some of these treatments are color extraction, degassing or aging.

The use of ultrasound is a growing field of research, which is increasingly being implemented in the food industry for both analysis and modification of its products. Ultrasound is an inaudible acoustic wave that covers a frequency range from 20 kHz to 2 MHz. This wide range of frequencies offers a wide variety of applications whose exploitation forms the basis of the development of ultrasound applications.

Thus, this work, developed over sixteen months, aims to analyze the feasibility of using ultrasound techniques associated with wine degassing as well as their influence on yeast during fermentation, also serving to answer the current issues of the wine industry. As such, the main objectives are:

- study of the influence of the use of ultrasound during the fermentation process, as a possible substitution of chemical and physical processes;
- evaluation of the best ultrasound application time in the samples, to obtain a higher degassing;
- temperature optimization;
- optimization of sample volume used in ultrasound assays.

As mentioned above, in order to respond to market demands, TRATIVI, a Portuguese company specialized in wine technology, decided to initiate a study associated with the application of ultrasound in the production of wines, in order to verify if some parts of the wine could be improved. productive process. As such, the study was based on the evaluation of the use of ultrasound as a means for degassing the wine and on the evaluation of its influence on yeast during fermentation. Several tests were conducted, with different application times, and always with the same frequency (20 kHz).

Firstly, an analysis was made of the wine concerned (sparkling wine) in order to know its characteristics for this study. Starting by responding to the challenges posed by the company, we sought to study the influence of ultrasound in the course of a fermentation. For this, fermentations were performed with a matrix, which was designated as White Matrix. In a second approach, the effect of ultrasound on degassing of wine at different initial sample temperatures was studied using a constant volume of 50 mL. Finally, the effect of ultrasound on wine degassing as a function of sample volume was analyzed. These assays were performed for four volumes (25, 50, 75 and 100 mL). For each of these volumes five different initial temperatures (10, 14, 16, 18 and 20 degrees Celsius) were used. The degassing level is associated in all cases with the difference between the initial and final CO₂ values in the samples.

After conducting the study in question and analyzing the results obtained, it is concluded that:

- effectively, ultrasound is destructive to yeast, causing yeast autolysis;
- the values obtained from reduction percentages from the beginning to the end of the fermentation (30%) are promising and show that it is possible to accelerate the batching process;
- samples were more stable using an application time of three minutes;
- the maximum degassing point almost always occurs near an initial temperature of 16°C;
- as sample volume increases, degassing decreases.

Keywords: Bâttonage, Degassing, Wine, Ultrasound

Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo	4
Abstract.....	6
Índice	8
Índice de Figuras	10
Índice de Tabelas	12
Lista de Acrónimos, Siglas e Abreviaturas	18
1. Introdução	2
1.1. Enquadramento do estágio	2
1.2. Empresa	2
1.3. Objetivos.....	2
1.4. Estrutura do documento.....	3
2. Estado de arte	6
2.1. Vinho	6
2.1.1. Breve História.....	7
2.1.2. Produção	7
2.2. Tipos de Vinho	11
2.3. Caso de Estudo	12
2.4. Ultrassons.....	17
2.4.1. Efeitos dos ultrassons	19
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Técnicas de análise	22
3.2. Metodologia de estudo.....	23
3.3. Determinações efetuadas às amostras de vinho e da Matriz Branca	23
3.1.1. Acidez Total.....	23
3.1.2. Anidrido Sulfuroso Livre.....	24
3.1.3. pH	24
3.1.4. Dióxido de Carbono.....	25

3.1.5. Contagem de células em câmara de Neubauer	26
3.4. Planeamento do estudo experimental, em função dos objetivos de estudo...	27
4. Resultados e Discussão	30
4.1. Estudo da influência dos ultrassons durante a fermentação.....	30
4.2. Análises físico-químicas ao vinho espumante	37
4.3. Tempo de aplicação ideal dos ultrassons nas amostras de vinho espumante	38
4.4. Estudo da influência da temperatura inicial da amostra no processo de degaseificação	39
4.5. Estudo da influência do volume de amostra no processo de degaseificação 46	
5. Conclusões	50
5.1. Trabalhos futuros	53
Bibliografia	55
Anexos	58

Índice de Figuras

Figura 1-Etapas do processo produção de vinho.	8
Figura 2-Vinho Espumante de Qualidade “Casa Senhorial do Reguengo” utilizado no decorrer dos ensaios.	14
Figura 3-Etapas do processo de produção de vinho espumante [11].	14
Figura 4-Imagem ilustrativa da técnica de remuage, usado no método de champanoise (método tradicional para a produção de champanhe e espumante).	16
Figura 5- Titulação da amostra para a determinação de CO ₂	25
Figura 6-Imagem ilustrativa de uma Câmara de Neubauer [23].	26
Figura 7-Representação e vista ao microscópio da câmara de Neubauer, dividida em 9 quadrantes [23].	27
Figura 8- Figura representativa das quatro fases do crescimento microbiano [24].	34
Figura 9-Amostra de vinho 1 minuto de ultrassons.	39
Figura 10- Amostra de vinho 2 minutos de ultrassons.	39
Figura 11- Amostra de vinho aplicando 3 minutos de ultrassons.	39
Figura 12- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 25 mL.	40
Figura 13- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 50 mL.	41
Figura 14- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 75 mL.	41
Figura 15- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 100 mL.	42
Figura 16- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 25,50,75 e 100 mL.	43
Figura 17-Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 25 mL.	44
Figura 18- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 50 mL.	44
Figura 19- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 75 mL.	45
Figura 20- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 100 mL.	45

Figura 21 -Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 10^\circ\text{C}$	46
Figura 22 - Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 14^\circ\text{C}$	46
Figura 23 -Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 16^\circ\text{C}$	47
Figura 24 -Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 18^\circ\text{C}$	47
Figura 25 -Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 20^\circ\text{C}$	47

Índice de Tabelas

Tabela 1- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 1 minuto.) e percentagem de redução, no dia de inoculação da levedura.	32
Tabela 2- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 1 minuto.) e percentagem de redução, no primeiro dia da fermentação.	33
Tabela 3- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempos de aplicação de 1, 2 e 3 minutos.) e percentagem de redução, no último dia da fermentação.	34
Tabela 4- Resultados obtidos para a contagem de células da levedura inoculada e hidratada durante 2h, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 3 minutos).	36
Tabela 5- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH, para as amostras de vinho antes da aplicação de 3 minutos de Ultrassons.	37
Tabela 6- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH, para as amostras de vinho depois da aplicação de 3 minutos de Ultrassons.	37
Tabela 7- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH médios, para as amostras de vinho antes e após a aplicação de 3 minutos de Ultrassons.	38
Tabela 8- Resultados relativos ao cálculo do n' (diferença de volumes), no ensaio em branco.	67
Tabela 9- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos), para o cálculo do CO ₂ inicial.	67
Tabela 10- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de degaseificação inicial (na garrafa). Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).	67
Tabela 11- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação do CO ₂ inicial na garrafa, em amostras com um volume de 50 mL.	68
Tabela 12- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).	68

Tabela 13-Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).....	69
Tabela 14-Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 10°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.	69
Tabela 15- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).	70
Tabela 16-Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).....	70
Tabela 17- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 13°C e 18°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.....	70
Tabela 18- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).	71
Tabela 19- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).	71
Tabela 20- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 16°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.	72
Tabela 21- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).	72
Tabela 22- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).	72
Tabela 23- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.	73
Tabela 24-Compilação dos resultados, relativamente aos ensaios realizados para as temperaturas de 10°C, 13°C, 16°C, 18°C e 20°C, com um volume de amostra de 50 mL.	73

Tabela 25- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO ₂ para amostras com um volume de 25 mL.....	74
Tabela 26- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO ₂ para amostras com um volume de 50 mL.....	74
Tabela 27- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO ₂ para amostras com um volume de 75 mL.....	74
Tabela 28- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO ₂ para amostras com um volume de 100 mL.....	74
Tabela 29- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.	75
Tabela 30- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).	75
Tabela 31- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 10°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.....	76
Tabela 32- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.	76
Tabela 33- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).	76
Tabela 34- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 13°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.....	77
Tabela 35- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.	77
Tabela 36- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre	

os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).....	77
Tabela 37- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 16°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.....	78
Tabela 38- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.	78
Tabela 39- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).....	79
Tabela 40- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 18°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.....	79
Tabela 41- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.	79
Tabela 42- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).....	80
Tabela 43- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação da percentagem da variação do CO ₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.....	80
Tabela 44- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 10°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO ₂	80
Tabela 45- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 13°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO ₂	81

Tabela 46- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 16°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂. 81

Tabela 47- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 18°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂. 81

Tabela 48- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 20°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂. 82

Lista de Acrónimos, Siglas e Abreviaturas

a.C.	Antes de Cristo
CIETI	Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial
CO₂	Dióxido de Carbono
CV/mL	Células Vivas por mililitro
LQ	Limite de Quantificação
OIV	Organização internacional da vinha e do vinho
SO₂	Dióxido de Enxofre
Tf	Temperatura final
Ti	Temperatura inicial
ta	Tempo de aplicação
VEQ	Vinho Espumante de Qualidade

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Neste capítulo é feito o enquadramento desta tese de mestrado, apresentando-se os objetivos principais. Será feita uma breve introdução ao tema em estudo, que levou à elaboração desta dissertação, bem como uma pequena apresentação da introdução à empresa parceira deste projeto e finalmente será descrita a estrutura do documento. Irá ser feito também um enquadramento relacionado com o âmbito da realização da presente dissertação, e posteriormente serão introduzidos quais os objetivos da mesma. Por fim será descrita a estrutura do documento.

1.1. Enquadramento do estágio

A realização desta Dissertação enquadra-se na unidade curricular de Dissertação/Estágio, do 2º ano de Mestrado em Engenharia Química, com início a 15 de março de 2018 e término a 28 de junho de 2019.

A parte experimental do estágio foi realizada nos laboratórios de investigação do Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI), no Laboratório de Tecnologia Química e ainda nos Laboratórios de Química e Biologia do ISEP.

1.2. Empresa

A TRATIVI é uma empresa Portuguesa, fundada na década de oitenta, do século passado. O seu fundador, Eng.º Francisco Oliveira, pretendeu, com esta, aproveitar o nicho de mercado associado à diminuta oferta de soluções tecnológicas associadas à produção vinícola. A empresa está localizada no Norte de Portugal, em Vila Nova de Gaia, especificamente em Canelas.

A empresa, dada a vasta experiência, no sector enológico, dos seus colaboradores, desenvolveu tecnologias avançadas aplicadas a este mercado, sendo detentora, atualmente, de produtos "*state of the art*", ou seja, são produtos que passam pelas etapas mais recentes no desenvolvimento de um produto, incorporando as mais modernas ideias e recursos. A TRATIVI está apta a realizar projeto de adegas "chave na mão" quer no mercado português quer no mercado internacional [1].

1.3. Objetivos

O principal objetivo desta dissertação cujo tema é "Aplicação dos Ultrassons ao processo produtivo do vinho" centra-se no estudo da viabilidade do uso de técnicas de ultrassons associadas à desgaseificação do vinho, uso de ultrassons de forma a avaliar se

será possível a sua utilização associada a desgaseificação do vinho. Este estudo foi realizado com o principal objetivo de responder a algumas exigências do mercado vinícola.

A realização deste estudo teve objetivos específicos:

- estudar a influência do uso de ultrassons durante o processo de fermentação;
- verificar qual o melhor tempo de aplicação dos ultrassons nas amostras, para se obter uma maior desgaseificação;
- otimizar a temperatura de desgaseificação;
- otimização do volume de amostra.

Assim sendo, foram realizados diferentes ensaios, de forma a tentar inferir de que forma a utilização dos ultrassons poderá ser benéfica, ou não, durante o processo de produção do vinho, usando para este efeito um vinho espumante.

Como objetivos secundários, a realização da dissertação permite aos Estudantes conhecerem e contactarem com o mercado de trabalho, num dos diferentes ramos da engenharia química, bem como consolidar, ao mesmo tempo que vão aplicando, algumas das competências que têm vindo a ser desenvolvidas ao longo de toda a licenciatura e mestrado.

1.4. Estrutura do documento

A presente dissertação de mestrado encontra-se organizada em diferentes capítulos:

O capítulo 1, denominado introdução, onde é feita uma introdução ao trabalho, um enquadramento do estudo, os objetivos do mesmo e ainda é apresentada a estrutura do documento. No Capítulo 2, estado de arte, é feita uma compilação de algumas das aplicações dos ultrassons na indústria atual, bem como uma introdução ao vinho e aos ultrassons, onde estes são explorados de forma mais exaustiva. No capítulo 3, descrição da técnica, será feita uma descrição das técnicas usadas, das metodologias de estudo, das determinações efetuadas e ainda do planeamento do estudo experimental. O capítulo 4 é focado na demonstração e discussão dos resultados obtidos. Seguidamente, no capítulo 5 apresentam-se as conclusões e os trabalhos futuros, seguindo-se a bibliografia.

Capítulo 2

Estado de Arte

2. Estado de arte

Estima-se que os ultrassons tenham sido desenvolvidos durante a Segunda Guerra Mundial. Os ultrassons, mesmo quando usados numa frequência muito alta não são nocivos ao homem, uma vez que não se propagam bem no ar, sendo a sua frequência absorvida pelas moléculas dos gases que o formam. No entanto, quando usados em baixa intensidade, podem fornecer informações e ainda melhorar a estrutura biológica do indivíduo. Já quando usados em alta frequência, são empregues em corpos sólidos e líquidos [2].

Atualmente, e tentando atender às exigências do mercado industrial, é cada vez maior o cuidado por parte das indústrias em desenvolver tecnologias inovadoras que além de apresentarem baixo custo, sejam também capazes de promover um maior rendimento, eficácia e eficiência no processo industrial sem, no entanto, ferir o meio ambiente. Os ultrassons são uma dessas técnicas [3]. Cada vez mais esta técnica é usada em diferentes áreas da indústria tais como:

- extração de subprodutos do chá verde (Ex. Catequinas, Teaflavinas) [3]
- extração de subprodutos das uvas
- extração de subprodutos de folhas de plantas [4]
- indústria Aeronáutica [5]
- conservação de alimentos [6]

Os ultrassons são ainda usados com outros fins, como para a medicina, fisioterapia e ainda estética.

2.1. Vinho

Desde tempos longínquos que o vinho desempenha um papel de relevo em quase todas as civilizações. Genericamente, é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação do sumo de uva. Na União Europeia, o vinho é legalmente definido como sendo o produto obtido exclusivamente por fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas, ou de mostos [7].

A forma como as uvas apresentam a sua composição, permite que estas fermentem sem que lhes sejam adicionados açúcares, ácidos, enzimas ou outros tipos de nutrientes. Dependendo do tipo de vinho, pode utilizar-se uma imensa variedade de uvas e de leveduras.

2.1.1. Breve História

O vinho tem grande importância histórica, pois o seu aparecimento, em tempos remotos, tornou-o um produto que acompanhou grande parte da evolução económica e sociocultural de várias civilizações ocidentais e orientais.

O vinho possui uma longínqua importância histórica e religiosa. Cada cultura conta a história do seu surgimento de forma diferente. Os cristãos, afirmam que foi Noé quem plantou uma vinha e com ele produziu o primeiro vinho do mundo. Já os gregos consideraram a bebida uma dádiva dos deuses. Nas Hititas, babilónicas, sumérias, as histórias foram adaptadas de acordo com a tradição e crença do povo.

Do ponto de vista histórico, a sua origem precisa é impossível de afirmar, pois considera-se que o vinho nasceu antes da escrita. Os enólogos dizem que a bebida surgiu por acaso, talvez por um punhado de uvas amassadas esquecidas num recipiente, que sofreram posteriormente os efeitos da fermentação. O cultivo das videiras, para a produção do vinho, só foi possível aquando da sedentarização dos nômades. Existem referências que indicam a Geórgia como o local onde provavelmente se produziu vinho pela primeira vez, uma vez que foram encontradas neste local grainhas datadas entre 8000 a.C. e 5000 a.C. [8].

Relativamente ao seu aparecimento na Europa, terá ocorrido há aproximadamente 6500 anos, nas atuais Bulgária ou Grécia, tendo-se tornado muito comum na Grécia e Roma antigas [7] [9]. Atualmente, o vinho é produzido no mundo inteiro, e a sua produção passa por um rígido controle de qualidade, que vai desde o cultivo da uva até ao consumidor.

2.1.2. Produção

Vinho (do latim *vīnum*, que tanto pode significar "vinho" como "videira") é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mosto de uvas, conseguida por intermédio de microrganismos (leveduras), os quais transformam o açúcar do sumo em álcool, dióxido de carbono e ainda uma série de outros produtos secundários, em quantidades variadas.

O processo de produção do vinho pode ter mais ou menos etapas, dependendo do estilo de vinho que se deseja obter e, também, da filosofia de cada produtor. O processo genérico de produção do vinho encontra-se esquematizado na Figura 1 [10].

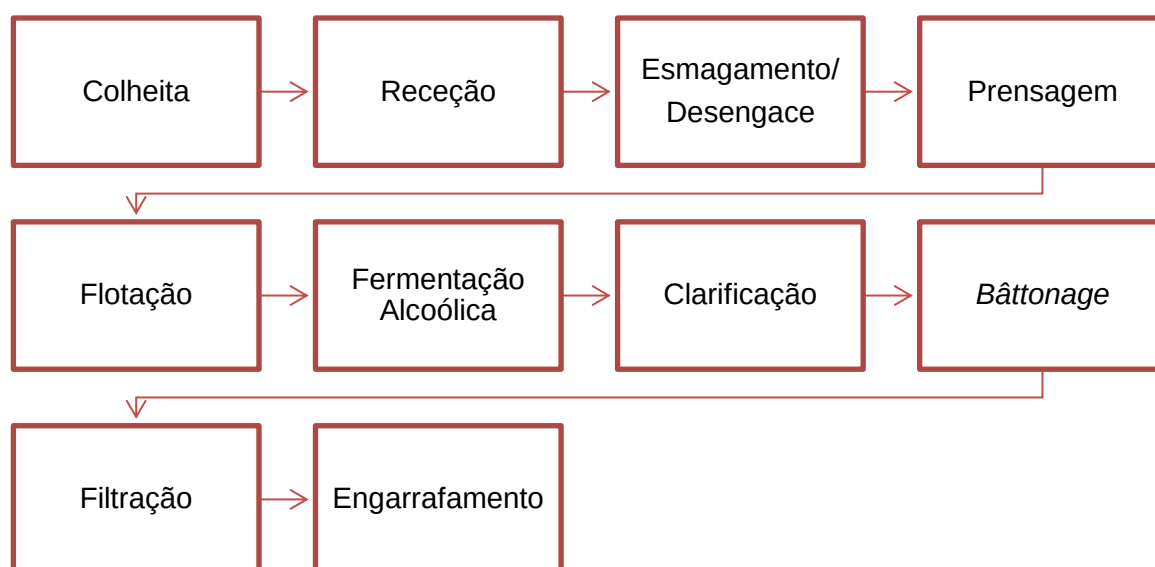


Figura 1-Etapas do processo produção de vinho.

Colheita

Denomina-se vindima a operação da colheita de uva para a vinificação. O momento da colheita depende de vários fatores, sendo os mais importantes, o estado sanitário e o grau de maturação das uvas que irá depender do tipo de vinho que será produzido. Para que as uvas cheguem ao local de fabrico sãs e maduras devem-se ter alguns cuidados, nomeadamente, no transporte. Este deve ser rápido e deve-se evitar o esmagamento das uvas, o que levaria à sua oxidação e maceração [11].

De modo a garantir que o mosto não entra antecipadamente em fermentação, as uvas devem ser processadas no momento em que chegam ao lagar. Um dos aspetos mais importantes a considerar é o grau de maturação das uvas. Nos últimos dias de amadurecimento, o bago de uva sofre um aumento da quantidade de açúcares e uma redução dos ácidos. Ao mesmo tempo que se selecionam os bagos bons dos podres ou secos, devem-se retirar as folhas, os ramos e outros materiais indesejáveis à produção de um vinho de qualidade.

Receção

Nesta etapa é importante que sejam mantidas as condições higiénicas adequadas quer nos tanques, quer em todo o material usado no processo de fabrico e ainda nos vasilhames para armazenamento do vinho [11].

Desengace/ Esmagamento

O desengace tem por objetivo separar o engaço dos bagos, antes de entrarem no reator/tanque onde decorrerá a fermentação, visto que estes conferem ao vinho um sabor desagradável. O engaço provoca ainda alterações na temperatura de fermentação e na acidez do mosto.

A etapa de esmagamento consiste no processo de trituração de uvas, resultando na libertação de mosto pela rutura das películas, pois sem esta operação, a fermentação não teria início [11].

Prensagem

É uma operação que consiste na extração do mosto/sumo das uvas, sendo indispensável ao processo de vinificação. Esta, é feita através de uma prensa, que esmaga as uvas com o objetivo de retirar todo o líquido que se encontra nos bagos, utilizando o mínimo de força possível, para se obter uma extração suave e eficiente. Neste processo obtém-se o bagaço prensado [11].

Flotação

A flotação é uma técnica de separação que, a par da decantação, utiliza a diferença de densidade específica entre os líquidos e os sólidos para os separar. Na decantação, a fração sólida tem uma densidade específica superior à da fração líquida. No caso da flotação, a situação é oposta. Esta condição é obtida através da dissolução de um gás (ar, oxigénio, azoto), que adere à superfície das partículas sólidas, formando complexos gás-sólidos mais leves do que a fração líquida, que podem ser separados por flotação.

A flotação pode ser contínua ou descontínua, mas em ambos os casos, em comparação com o processo de decantação apresenta algumas vantagens, entre as quais se destacam:

- acelerar o tempo de clarificação do mosto, permitindo assim uma melhor rotação dos depósitos e cubas;
- diminuir a necessidade de refrigeração, relativamente ao processo de decantação;
- a possibilidade de se obterem mostos muito límpidos e, por consequência, vinhos com notas frutadas muito intensas, graças ao uso adequado de coadjuvantes de clarificação

Fermentação alcoólica

Designa-se por fermentação alcoólica o fenómeno que transforma o mosto em vinho, o que corresponde essencialmente à reação dos açúcares, com libertação de CO₂. Este processo inicia-se após o esmagamento das uvas. A fermentação é provocada por fermentos – as leveduras. Estas são muito abundantes nas uvas, na época da vindima e encontram-se espalhadas sobre a película da uva, no engaço e por toda a vinha.

A temperatura ótima para que ocorra a fermentação deve manter-se perto dos 25°C. Quando a temperatura é superior a 33°C, o desenvolvimento das bactérias torna-se mais eminente, competitivo e rápido, o que leva ao decréscimo da atividade das leveduras e à deterioração do vinho [11].

Clarificação

A clarificação é a operação que tem como objetivo eliminar as substâncias em suspensão e outras em dissolução existente nos vinhos, para os tornar límpidos e cristalinos. Um vinho turvo não deixa apreciar a cor e pode apresentar um mau sabor, devido à sensação que as partículas sólidas deixam na língua.

Bâtonnage

Bâtonnage é um termo francês que significa o mexer ou agitar das borras em depósito, no fundo de um determinado recipiente. Esta agitação coloca novamente em suspensão as borras, que, ricas em aminoácidos e com um relativo poder redutivo, irão melhorar o gosto e textura do vinho. Este processo pode-se prolongar de 4 a 12 meses, onde o vinho se mantém em contacto com as borras. Como referido, através desta técnica, os vinhos tornam-se mais estáveis face à oxidação e resulta num produto final mais untuoso, robusto e harmonioso [12].

Atualmente existe outro processo (*bâtonnage* forçada) que substitui o processo tradicional. Consiste na junção de um processo térmico com um processo de agitação, o que acelera o processo. Contudo, apresenta uma enorme desvantagem: a decomposição das características do vinho. A TRATIVI recorre a esta etapa do processo, contudo a *bâtonnage* é opcional.

Filtração

É a operação mecânica por meio da qual um vinho turvo, é passado através de filtros porosos, e se separa das partículas que estão em suspensão. A filtração substitui, ou completa, a ação das trasfegas.

Engarrafamento

Nenhum vinho deve ser bebido imediatamente após ter sido engarrafado. Este deve ser deixado repousar de um a três meses dependendo do tipo de vinho. O engarrafamento, por mais cuidadoso que seja, causa uma perturbação no vinho. Determinados vinhos passam por um envelhecimento adicional em garrafa, mais ou menos longo, antes de serem comercializados.

A finalidade da rolha de cortiça é garantir o suprimento de ar na quantidade exata para que o vinho envelheça no ritmo certo. A cor das garrafas deve ser preferencialmente escura, de modo a impedir que a incidência de luz possa exercer uma ação negativa sobre a estabilidade do vinho.

2.2. Tipos de Vinho

Vinho “Colheita Tardia”

Designa-se por vinho de colheita tardia, um vinho que é feito através de uvas vindimadas mais tarde do que o habitual, ultra-maduras, quase transformadas em uvas-passas na videira. Todos estes vinhos dependem do tipo de amadurecimento, para ter o teor de açúcar elevado característico [13].

Vinho Espumante

É considerado espumante todo o vinho que sofra uma segunda fermentação alcoólica e cujo dióxido de carbono é naturalmente contido no recipiente. Quando a segunda fermentação se dá na garrafa, é denominado por método tradicional. Quando a segunda fermentação se dá noutros recipientes fechados, é denominado método *Charmat*. Quando a fermentação se efetua através da passagem do vinho por diferentes tanques (onde o vinho fermenta e envelhece), é chamado de método contínuo [13].

Vinho Tinto

Os vinhos tintos são produzidos a partir de variedades de uvas tintas, com maceração. Dependendo do estágio que apresentam, podem ser tintos para consumo enquanto ainda são vinhos jovens ou tintos de guarda.

A variedade de cores do vinho tinto alterna entre o vermelho vivo (rubi) ou vermelho púrpura, e o alaranjado (cor tijolo). Os vermelhos vivo e púrpura, normalmente são cores típicas de vinhos jovens. À medida que vão envelhecendo, os vinhos vão perdendo matéria corante e a nova cor apresenta-se com tonalidades atijoladas [13].

Vinho Rosé

Produzidos a partir de uvas tintas, podem ser produzidos de duas formas: a partir de uma maceração ligeira de uvas tintas, que depois seguem o processo de vinificação em bica-aberta (típico dos vinhos brancos, e que consiste na vinificação do mosto sem as películas), ou, através da mistura entre vinho branco e tinto.

No que respeita às diferentes cores que estes podem apresentar, começam no rosa-pálido e depois seguem-se o rosa-peónia, cereja, framboesa, morango, rosa-velho, rosa-alaranjado, damasco e salmão.

Quanto aos aromas, um vinho rosé quer-se aromático. Devem ser consumidos enquanto jovens (1 a 2 anos) e servidos ligeiramente frescos, entre 10°C e 13° C.

Vinho Branco

Os vinhos brancos são, na sua maioria, produzidos a partir de uvas brancas. Podem ainda ser obtidos a partir de uvas tintas, desde que as películas não entrem em contacto com o mosto. No que respeita à cor, pode variar entre o amarelo esverdeado e o amarelo dourado. Quanto mais jovem for o vinho, mais clara será a sua cor. Os tons amarelados, como o amarelo palha, e o amarelo dourado aplicam-se aos vinhos brancos já com uma certa idade, ou, caso não seja este o motivo, pode ser indicativo de que o vinho está oxidado [13].

Assim sendo, pode ter-se brancos para consumir jovens, e que devem ser consumidos a uma temperatura entre os 8° e os 10°C. Os brancos de guarda têm intensidade aromática e boa complexidade, apresentando nesses casos, uma cor dourada e aromas tostados e de fruta tropical. Devem ser servidos a uma temperatura que ronde os 12°C a 14°C.

Vinho Licoroso

Os vinhos fortificados, ou licorosos, são aqueles cuja fermentação alcoólica é interrompida pela adição de aguardente vínica, numa dada altura da fermentação. De acordo com o momento da interrupção, e da uva utilizada, permanecerá mais ou menos doce. O grau alcoólico final dos vinhos fortificados fica entre os 19% e os 22% vol. São exemplo de vinhos licorosos, produzidos em Portugal: o vinho do Porto, da Madeira, de Carcavelos, Moscatel de Setúbal e Moscatel do Douro [13].

2.3. Caso de Estudo

O estudo realizado no decorrer desta dissertação de mestrado, foi focado para amostras de vinho espumante, nomeadamente o VEQ “Casa Senhorial do Reguengo” ilustrado na Figura 2. Neste caso, usou-se como base de estudo amostras de VEQ, uma vez

que na data de início da dissertação (15 de março de 2018), a empresa não tinha em sua posse vinho acabado de fermentar com dióxido de carbono residual resultante da fermentação. Como tal, e de forma a tentar recriar as condições de um vinho acabado de fermentar, usou-se vinho espumante. Esta escolha relaciona-se com o facto de o VEQ em estudo, apresentar um elevado teor de dióxido de carbono dissolvido naturalmente (o que reduz as probabilidades de erro nas determinações, associadas à injeção artificial de CO₂ nos vinhos). Outro dos motivos pela qual foi usado VEQ e não vinho acabado de fermentar, terá sido o facto de assim ser possível de se manter as características das amostras ao longo do desenvolvimento da dissertação, o que não seria possível se fosse usado vinho acabado de fermentar. Uma vez que este trabalho está direccionado para determinações em vinho espumante, é importante fazer um enquadramento legal.

De acordo com o nº 5 do anexo III do Regulamento (CE) nº 491/2009 [14], entende-se por Vinho Espumante de Qualidade (VEQ) o produto que é obtido após primeira, ou segunda, fermentação alcoólica de uvas frescas, de mosto de uvas, ou de vinho, que liberta, quando se procede à abertura do recipiente, dióxido de carbono proveniente exclusivamente da fermentação e que apresenta, quando conservado à temperatura de 20°C, em recipientes fechados, uma sobrepressão, devida ao dióxido de carbono em solução, igual ou superior a 3,5 bar.

A Casa Senhorial do Reguengo, localizada em Celorico de Basto, é uma quinta do tipo familiar com atividades na agricultura e turismo de habitação. Produz exclusivamente espumante a partir de uvas de vinho verde da região. A sua produção anual ronda as trinta e cinco mil garrafas.



Figura 2-Vinho Espumante de Qualidade “Casa Senhorial do Reguengo” utilizado no decorrer dos ensaios.

O processo de produção deste tipo de vinho, assemelha-se ao processo comum, possuindo mais algumas etapas, como será descrito nos parágrafos seguintes.

A Figura 3 ilustra o processo genérico de produção do vinho espumante.

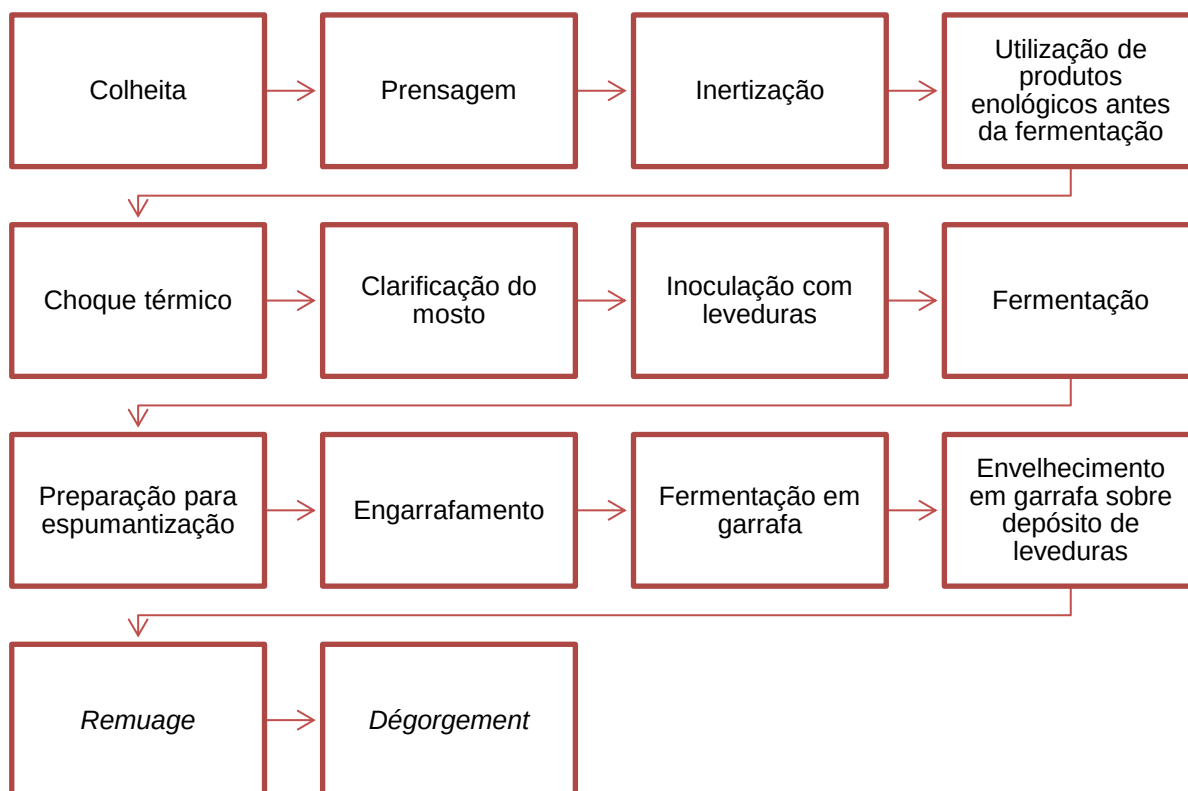


Figura 3-Etapas do processo de produção de vinho espumante [11].

Inertização

Os mostos brancos destinados à elaboração de vinho base para espumante são extremamente sensíveis à oxidação, com consequências terríveis para o produto final. Assim, a inertização é crucial, uma vez que a quantidade de antioxidante que é possível utilizar é muito reduzida [11].

A partir do momento em que se dá o esmagamento e o mosto entra em contacto com o ar, deve-se garantir que a atmosfera que o rodeia contém o mínimo de oxigénio possível. Para tal, tenta-se substituir o ar desta atmosfera envolvente por um gás que evite oxidações (o mais utilizado é dióxido de carbono). A partir do momento em que a fermentação começa a produzir CO₂, o mosto passa a estar protegido da oxidação.

Utilização de produtos enológicos antes da fermentação

Esta etapa é utilizada para evitar oxidações, bem como o desenvolvimento de microrganismos. No caso da obtenção de vinhos base para espumante, o teor de sulfatos adicionado deve ser relativamente baixo, de modo a não comprometer a atividade das leveduras empregues na segunda fermentação [11].

Choque Térmico

Consiste em baixar a temperatura do mosto, após a prensagem, para os valores desejados, evitando assim que as enzimas oxidativas e os microrganismos entrem em funcionamento, de modo a facilitar o processo de clarificação.

Preparação para espumantização

Esta etapa subdivide-se em quatro fases:

Lotação

A lotação é o segredo dos produtores de *Champagne* que todos os anos guardam alguns vinhos com elevado potencial de evolução – os chamados "*Vins de Réserve*" – conservando-os normalmente sobre borras finas durante 2 a 3 anos. Esta guarda permite-lhes, em lotação, manter o estilo próprio da "casa", bem como contornar as variações de colheita para colheita.

Colagem

Processo que permite clarificar o vinho através da remoção de sólidos em suspensão.

Refrigeração

Consiste em baixar a temperatura do vinho até muito próximo do seu ponto de congelação.

Filtração

É o processo pelo qual se garante a clarificação extrema dos vinhos.

Fermentação em garrafa

Após engarrafamento, as garrafas são capsuladas com a vulgar cápsula de coroa e colocadas na horizontal. Escolhe-se o período mais frio do ano, geralmente janeiro, para que a fermentação se prolongue por cerca de um a dois meses, sob uma temperatura relativamente baixa, entre 10°C a 12°C. Estas condições garantem uma fermentação lenta e regular, muito importante para a qualidade do produto final [11].

Remuage

Remuage, palavra em francês, que designa a operação que consiste em girar as garrafas, colocadas de cabeça para baixo de forma a decantar os sedimentos da fermentação do champanhe e dos espumantes, para que fiquem perto da rolha [11].

Aproximando-se a altura de colocar o espumante no mercado, é necessário garantir que o depósito das leveduras é integralmente removido. Para tal, tradicionalmente as garrafas eram colocadas em "*pupitres*" onde eram rodadas e progressivamente colocadas na posição vertical com o gargalo para baixo, para que o depósito se fosse aproximando do topo do gargalo, num processo que poderia demorar mais de um mês. A Figura 4 ilustra o exposto.



Figura 4-Imagem ilustrativa da técnica de *remuage*, usado no método de *champanoise* (método tradicional para a produção de champanhe e espumante).

Atualmente, este processo realiza-se em "giro paletes" com uma duração de aproximadamente oito dias. As "giro paletes" simulam a *"remuage"* à moda antiga, mas permitem que se poupe tempo, espaço e mão-de-obra preciosos [11].

Dégorgement

Com o depósito totalmente arrastado para o fundo do gargalo, há que realizar o *"dégorgement"*, que consiste em retirar simultaneamente a cápsula e o depósito num movimento só. Antigamente, este processo era feito manualmente *"à la volée"*. Atualmente, utiliza-se apenas o método de congelação, através do qual se congela a parte superior do gargalo, onde está depositado todo o sedimento, que depois de congelado, é expulso com a abertura da cápsula, ficando o espumante livre do depósito e pronto a ser atestado e rolhado [11].

Após o *"dégorgement"*, a garrafa de espumante perdeu algum o seu volume sendo necessário atestá-la. Por norma, é geralmente utilizado um "licor de expedição" para realizar o atesto. Este licor contém açúcar e a sua dose permite produzir espumantes que vão desde o Extra-Bruto, Bruto, Meio-Seco, até ao Doce [11].

2.4. Ultrassons

O ultrassom é uma onda mecânica produzida pelo movimento oscilatório das partículas de um meio. Por ser uma forma de energia mecânica tem como principais propriedades a reflexão, a adsorção e a dispersão, precisando de um meio físico para se propagar, tais como sólidos, líquidos ou gases [15]. Os ultrassons dividem-se em duas categorias dependendo da sua frequência e intensidade. As aplicações de baixa intensidade são aquelas em que as ondas são utilizadas para obter informações sobre o meio em que se propagam. Este tipo de aplicações, não produz alterações no mesmo, sendo uma importante ferramenta em ensaios não destrutivos. Usam, normalmente, frequências de 2 a 20 MHz com intensidades inferiores a 1 W.cm^{-2} . Já as aplicações de alta intensidade são aquelas que têm por objetivo produzir efeitos permanentes no meio, utilizando este tipo de energia.

As ondas ultrassônicas de alta energia, situam-se entre os 20 e os 100 kHz. A potência associada varia entre os 10 e os 1000 W.cm^{-2} , possuindo assim um nível energético capaz de romper ligações intermoleculares.

Os ultrassons são produzidos a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora em frequências ultrassônicas. Os sistemas de aplicação de ultrassom mais utilizados são os banhos e as sondas.

Os parâmetros fundamentais que caracterizam as ondas de ultrassom são a velocidade (c), o comprimento de onda (λ), a frequência (f), a amplitude (A) e a intensidade (I) [16]. A velocidade (c), é a velocidade de propagação de um som num meio e está relacionada com o comprimento de onda e a frequência:

$$c = \lambda f \quad (1)$$

A velocidade de propagação depende das propriedades físicas do meio, através do qual as ondas se propagam. Para sólidos e líquidos, a velocidade está relacionada com a densidade (ρ) e o módulo de elasticidade (K):

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad (2)$$

No caso dos gases, a relação inclui a pressão (P), o calor específico a pressão constante (C_p) e ainda o calor específico a volume constante (C_v):

$$c = \sqrt{\frac{C_p \cdot P}{C_v \cdot \rho}} \quad (3)$$

A utilização do ultrassom em tecnologia de alimentos tem evoluído muito com o passar dos anos, pois é uma técnica que tem apresentado efeitos benéficos no processamento, na preservação, na diminuição dos tempos de processamento, na redução dos custos de operação e manutenção, na melhoria dos atributos de qualidade e na redução de agentes patogénicos [17].

Os ultrassons são conhecidos por apresentarem um efeito considerável em variados processos na indústria alimentar. Acredita-se que os processos alimentares realizados sob a ação de ultrassons, sejam afetados em parte por fenómenos de cavitação e pelo aumento da transferência de massa. Processos como congelamento, corte, secagem, revestimento, branqueamento, esterilização e extração foram aplicados eficientemente na indústria alimentar [18].

As vantagens do uso de ultrassons para o processamento de alimentos incluem: uma mistura mais eficaz, transferência de energia e de massa mais rápida, gradientes térmicos e de concentração reduzidos, extração seletiva, tamanho reduzido do equipamento, resposta mais rápida ao controle de extração do processo, aumento da produção e eliminação de etapas do processo.

Por exemplo, tratamentos térmicos como a pasteurização e a esterilização, são dos métodos mais empregues para destruir microrganismos e enzimas nos alimentos.

No entanto, a sua eficácia depende da temperatura e do tempo de tratamento, o que leva à perda de nutrientes, ao desenvolvimento de sabores e cores indesejáveis, e ainda à deterioração das propriedades organoléticas dos alimentos. Assim sendo, e de forma a tentar reduzir estes impactos negativos, novas tecnologias estão a ser estudadas, tendo vindo a ganhar um enorme interesse por parte das indústrias. O uso de ultrassons, em diversos processos da indústria, é um desses novos métodos. Embora a sua aplicação no processamento de alimentos seja relativamente recente, ficou provado que ondas ultrassônicas de alta intensidade podem romper células e desnaturar enzimas, e que mesmo os ultrassons de baixa intensidade poderão ser capazes de modificar o metabolismo das células [18].

Desta forma, a utilização dos ultrassons na tecnologia de alimentos para processamento, preservação e extração é uma abordagem inovadora e realça os sistemas de tecnologias emergentes.

Os ultrassons oferecem vantagens em termos de produtividade, rendimento e seletividade, apresentando melhor tempo de processamento, melhor qualidade, riscos químicos e físicos reduzidos, além de ser ecologicamente viável.

No decorrer deste estudo, foi utilizado o sistema de ultrassons “*Ultrasonic Homogenizers* HD 2070/HD 2200” cuja frequência é constante e de 20 KHz. Este equipamento é constituído por um gerador de energia elétrica, um conversor e uma sonda.

2.4.1. Efeitos dos ultrassons

Os ultrassons possuem efeitos físicos e químicos que dependem da frequência e da intensidade de aplicação, sendo a sua maioria resultante do fenómeno de cavitação [19] [20].

Os efeitos físicos dos ultrassons (cavitação) [2] resumem-se a:

- aumento da turbulência do meio sobre o qual atuam através da formação de bolhas que diminuem de tamanho, seguido da expansão e implosão, levando ao colapso das bolhas;
- mudanças químicas;
- aumento de pressão;
- temperatura [20].

O aumento da pressão produzido pelo colapso das bolhas durante a cavitação resulta na propagação das ondas de choque, causando severas turbulências. A energia gerada com o

colapso das bolhas é convertida em calor, levando a um aumento gradual da temperatura do meio.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

No presente capítulo serão descritas as técnicas, métodos e atividades desenvolvidas, a metodologia de estudo e as determinações efetuadas ao vinho espumante.

Por fim será descrito o planeamento do estudo experimental, em função dos objetivos propostos.

3.1. Técnicas de análise

Durante a realização desta dissertação de mestrado foram utilizadas as seguintes técnicas de análise:

- Método titulométrico
- Método potenciométrico
- Método de Neubauer

Os parâmetros analisados foram:

- Acidez Total
- Dióxido de Enxofre Livre e Total
- pH
- Dióxido de Carbono
- Contagem de Células Vivas

Dos parâmetros analisados, a Acidez Total, o SO_2 Livre, o SO_2 Total e o CO_2 , foram determinados pelo método titulométrico. Neste procedimento é medido o volume de um reagente (de concentração conhecida), designado por solução padrão (titulante). Esta solução reage com o analito (o que se está a analisar), à qual chamamos de titulado. Sabe-se que a reação chegou ao fim, quando ocorre o ponto de viragem, que corresponde ao ponto onde a quantidade de titulante adicionada equivale exatamente à quantidade de analito. Para a realização deste procedimento, utilizam-se matrizes, suportes universais e buretas.

A determinação do pH foi realizada através do método potenciométrico. Neste, é medida a diferença de potencial entre o eletrodo de medição e o eletrodo de referência, obtendo-se assim o pH da solução em estudo.

Por fim, a contagem de células vivas foi realizada ao microscópio, utilizando o Método de Neubauer. Neste, é usada uma lâmina grossa de uso microscópico, e de formato retangular, com uma depressão no centro, utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão.

3.2. Metodologia de estudo

Tal como mencionado no ponto anterior, o principal objetivo deste estudo foi a verificação da influência dos ultrassons durante o processo de produção de vinho.

O estudo inicial baseou-se na análise da influência dos ultrassons durante a fermentação do vinho. Para tal foram realizados ensaios usando uma Matriz Branca (levedura+água+açúcar), sendo assim simulada uma fermentação que duraria um máximo de três semanas. Ao longo do tempo em que a fermentação decorre, será necessário avaliar a evolução da mesma, ou seja, efetuar-se-á uma contagem de células.

Numa segunda fase do estudo, avaliar-se-á a influência dos ultrassons no produto final, onde se determinará quais as consequências da aplicação de ultrassons nas amostras (desgaseificação). Assim, é necessária uma prévia análise físico-química ao produto final de forma a conhecer-se as suas características, tais como acidez total, acidez volátil, pH e anidrido sulfuroso livre. No final é feita uma análise e discussão de resultados obtidos.

3.3. Determinações efetuadas às amostras de vinho e da Matriz Branca

De forma a verificar a composição do Vinho em estudo, foram realizadas um conjunto de análises, para garantir que os parâmetros analisados se encontram dentro dos valores rotulados na garrafa, bem como dentro dos valores legislados [14] [21].

Posteriormente realizaram-se as contagens de células vivas presentes na matriz branca.

3.1.1. Acidez Total

A acidez total do vinho é a soma dos ácidos tituláveis quando se leva o pH do vinho até 7 através da adição de uma solução alcalina titulada. O dióxido de carbono não está incluído na acidez total [22].

Para a determinação da acidez total é efetuada uma titulação na presença de azul de bromo timol, como indicador do fim da reação, por comparação com um padrão de cor. Este procedimento encontra-se descrito em anexo (Anexo I).

Segundo o Regulamento (CE) nº 491/2009 o teor de acidez total, expresso em ácido tartárico, não deve ser inferior a 3,5 gramas por litro, o que equivale a 46,6 miliequivalentes por litro de vinho.

3.1.2. Anidrido Sulfuroso Livre

O anidrido sulfuroso (SO_2) é visto como um precioso auxiliar na vinificação por apresentar um conjunto de propriedades, tais como:

- Ação dissolvente, que intensifica a maceração;
- Ação antioxidante, que protege alguns dos constituintes dos mostos e dos vinhos que são facilmente oxidáveis;
- Ação anti diastásica, que se traduz numa inibição e/ou destruição de algumas das enzimas presentes como a tirosinase e a lacase;
- Ação antisséptica, que o torna um bom conservante de mostos e de vinhos.

A determinação analítica é realizada através de uma titulação, com uma solução de iodo a 4 g/L. Ao SO_2 livre descrito no procedimento experimental do Anexo II, acresce a titulação iodométrica, após a hidrólise alcalina ao SO_2 total, que é o conjunto do SO_2 livre e SO_2 combinado, representando assim a totalidade das formas de dióxido de enxofre existentes nos vinhos.

O principal objetivo da realização desta análise é, antes de mais, constatar se as quantidades presentes no vinho se encontram dentro dos limites máximos legais, uma vez que quantidades elevadas de dióxido de enxofre traduzem-se em efeitos adversos de ordem organolética e toxicológica.

Segundo o Regulamento (CE) nº 606/2009, comissão de 10 de julho, os limites máximos de SO_2 total estabelecidos não podem exceder, no momento da sua colocação no mercado, para consumo humano direto, os seguintes valores:

- 185 mg/L no caso de todas as categorias de VEQ, Vinho Espumante de Qualidade;
- 235 mg/L no caso dos outros vinhos espumantes.

3.1.3. pH

O pH corresponde à concentração de iões de hidrogénio dissolvidos, neste caso no vinho, representando assim a acidez real do vinho. Este parâmetro, é analisado através de uma sonda que indica diretamente o valor de pH lido no vinho (ver Anexo III).

A importância desta determinação está associada ao fato de o pH possuir uma elevada relevância na estabilidade de um vinho. Um vinho que apresente um valor de pH superior a 3,50 significa que este apresenta uma certa fragilidade, havendo uma maior probabilidade

para o desenvolvimento de germes. Já nos vinhos tintos, um pH baixo pode perturbar as bactérias responsáveis pela fermentação maloláctica [22].

3.1.4. Dióxido de Carbono

Um espumante é um vinho com um nível significativo de CO_2 , fazendo-o borbulhar quando servido. O dióxido de carbono resulta de fermentação natural, seja ela feita dentro da garrafa (Método *champenoise*) ou fora dela (Método *Charmat*).

É importante salientar que existem diferentes categorias de vinhos efervescentes, classificando-se, entre outros, pela sobrepressão presente no vinho. O CO_2 pode advir naturalmente e na sua totalidade de uma segunda fermentação ou ser parcialmente adicionado. A Figura 5 apresenta a montagem laboratorial associada à medida da quantidade, em gramas por litro, de CO_2 .

Esta é realizada através de uma titulação. É através desta determinação que se estuda qual a influência da exposição aos ultrassons na desgaseificação do vinho. Esta encontra-se descrita detalhadamente no Anexo IV. Segundo o Regulamento (CE) nº 491/2009, Anexo III – 4, para vinhos espumantes, os níveis de sobrepressão devido ao CO_2 devem ser superiores ou iguais a 3,5 bar.

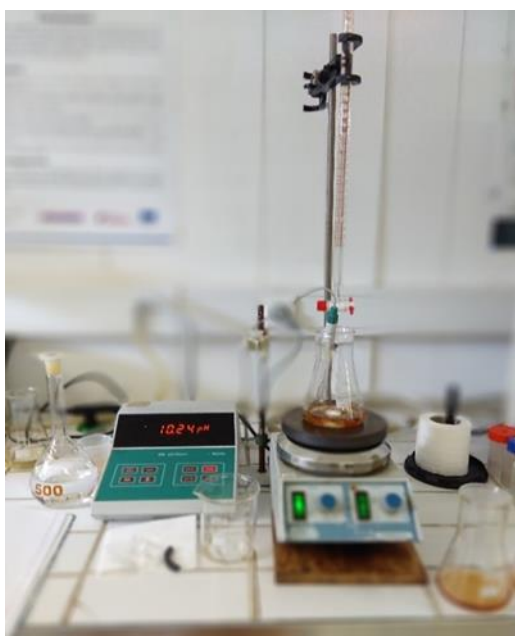


Figura 5- Titulação da amostra para a determinação de CO_2 .

3.1.5. Contagem de células em câmara de Neubauer

Uma das formas mais comuns de se obter uma estimativa do número de células é através da contagem ao microscópio, utilizando-se uma Câmara de Neubauer, também conhecida como Hemocitómetro ou Câmara de Contagem.

A Câmara de Neubauer é uma lâmina grossa de uso microscópico, com formato retangular e normalmente de vidro, com uma depressão no centro, utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. A Figura 6 representa uma imagem ilustrativa de uma câmara de Neubauer.

Esta é constituída por duas câmaras, ao centro, uma por baixo da outra, sobre as quais é colocada a lamínula para a leitura no microscópio. No centro destas câmaras há várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes. Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, de medidas conhecidas, que juntos formam um quadrado maior. Estes quadrantes são usados para fazer as contagens e assim determinar a concentração de células num determinado volume de fluido, para poder calcular a concentração de células no líquido global (do qual foi tirado a amostra analisada).

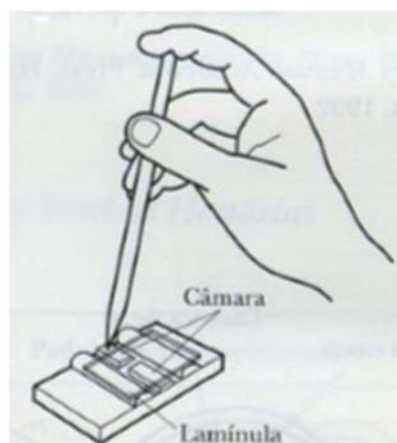


Figura 6-Imagem ilustrativa de uma Câmara de Neubauer [23].

Os procedimentos para contagem de células, bem como para a preparação da matriz branca encontram-se nos Anexos V e VI. A Figura 7 ilustra o exposto (representação e imagem real, vista ao microscópio, associada a um destes processos).

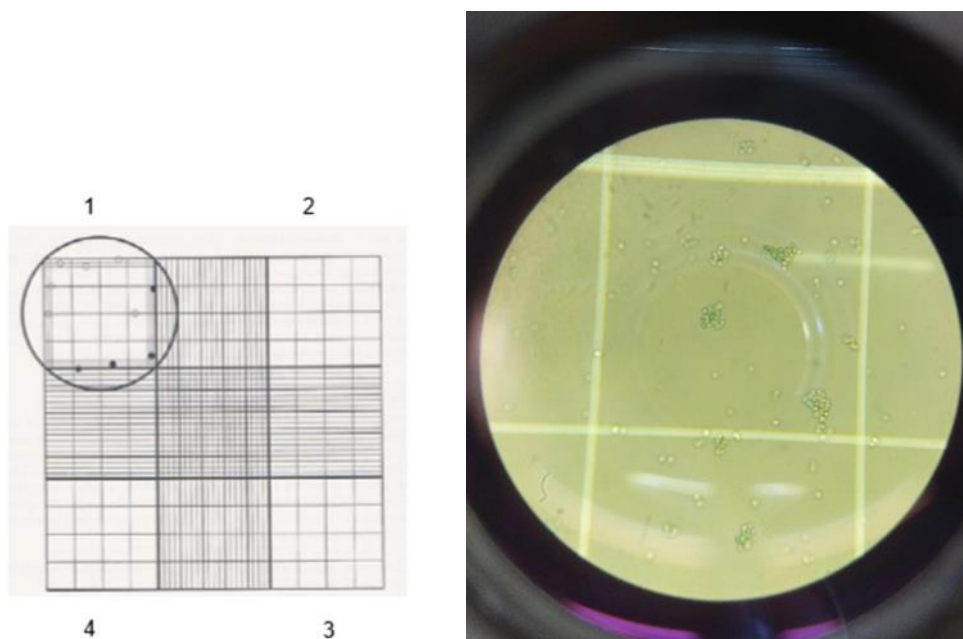


Figura 7-Representação e vista ao microscópio da câmara de Neubauer, dividida em 9 quadrantes [23].

3.4. Planeamento do estudo experimental, em função dos objetivos de estudo

Em primeiro lugar, realizou-se uma análise ao espumante em causa, de forma a conhecer as suas características, nomeadamente, a acidez total (g/L), dióxido de enxofre livre e total (mg/L) e pH.

Numa primeira fase do estudo, e começando por responder aos desafios colocados pela empresa, procurou-se clarificar quais seriam as influências dos ultrassons no decorrer de uma fermentação. Assim sendo, ao longo de quatro meses foram realizadas três fermentações, usando uma matriz - Matriz Branca. Esta consiste numa solução composta por água, levedura e açúcar invertido. Destas fermentações apenas se pode aproveitar uma, porque duas delas foram contaminadas.

Numa segunda fase, determinou-se o efeito dos ultrassons na degaseificação do vinho. Numa primeira, etapa estudou-se a aplicação de ultrassons, em função da temperatura inicial da amostra, para um volume de amostra de 50 mL. Finalmente, analisou-se o efeito dos ultrassons, em função do volume da amostra. Estes ensaios foram realizados para quatro volumes diferentes (25, 50, 75 e 100 mL). Para cada um destes volumes foram utilizadas cinco temperaturas iniciais diferentes (10, 14, 16, 18 e 20 °C).

O nível de degaseificação está associado, em todos os casos, à diferença entre os valores inicial e final de CO_2 nas amostras. Os resultados obtidos, podem ser vistos nas tabelas apresentadas nos Anexos VI e VII, respetivamente.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

Ao longo deste capítulo, serão apresentados todos os resultados, relativamente às duas fases do projeto, desenvolvidas ao longo da dissertação, nomeadamente:

Fase 1

- Estudo da influência dos ultrassons no processo de fermentação.

Fase 2

- Etapa 1: Avaliação do tempo ótimo de aplicação dos ultrassons no processo de degaseificação;
- Etapa 2: Estudo da influência da temperatura inicial da amostra, no processo de degaseificação;
- Etapa 3: Estudo da influência do volume de amostra no processo de degaseificação.

Serão ainda apresentados os resultados das análises físico-químicas feitas ao vinho espumante.

4.1. Estudo da influência dos ultrassons durante a fermentação

Apresentam-se seguidamente os resultados experimentais obtidos, ao longo do processo de fermentação e no seu final. Nesta fase foi estudada a influência do uso de ultrassons no decorrer de uma fermentação. Para tal foram realizados ensaios usando uma matriz (levedura+água+açúcar), simulando assim uma fermentação.

O ensaio de fermentação teve uma duração de aproximadamente 3 semanas, e os resultados experimentais, que se referem à contagem do número de células, encontram-se representados nas tabelas 1, 2 e 3.

A contagem de células foi feita em três momentos:

- no dia em que a levedura foi inoculada;
- no primeiro dia de fermentação;
- no último dia de fermentação.

Em estudo estiveram tempos de aplicação de ultrassons de um, dois e três minutos. Para os dois primeiros momentos (inoculação da levedura e primeiro dia de fermentação) usou-se um tempo de aplicação de um minuto. Para o último dia de fermentação usaram-se três tempos: um, dois e três minutos.

Na determinação do tempo ótimo de aplicação de ultrassons, foram testados um, dois, três, cinco, dez e vinte minutos de ultrassons. Os resultados dos ensaios revelaram-se pouco satisfatórios para tempos de aplicação superiores a três minutos, uma vez que:

- as amostras sobreaqueciam demasiado, atingindo temperaturas perto dos 65°C (podendo também ocorrer evaporação da amostra);
- quanto maior o tempo de aplicação, maior seria a perda da amostra uma vez que os ultrassons provocam borbulhação;
- o tempo de aplicação sendo superior a três minutos, as amostras demoravam mais tempo até estabilizarem (sem espuma, temperatura ambiente).

Como tal, os ensaios cujo tempo de aplicação de ultrassons foi superior a três minutos foram descartados. Em simultâneo realizaram-se ensaios para o vinho espumante (produto final), seguindo a mesma metodologia, e a conclusão foi semelhante. Concluiu-se então que o melhor tempo de aplicação dos ultrassons, para estes ensaios, seria o de três minutos, uma vez que para este tempo as amostras apresentavam-se mais estáveis com pouco borbulhar e espuma reduzida.

Como se pode verificar na Tabela 1, no dia de inoculação da levedura e antes da aplicação dos ultrassons, a amostra continha 192.500 células vivas/mL. Após a aplicação de um minuto de ultrassons na amostra, estas foram reduzidas para 103.750 células vivas/mL o que significa que ocorreu lise celular, correspondente a uma percentagem de redução de células vivas de 46,1%.

Tabela 1- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 1 minuto.) e percentagem de redução, no dia de inoculação da levedura.

Nº quadrado	Células Vivas s/ U.S.	Células Vivas após 1 minuto U.S.	% redução
1	21	2	90,5
2	16	4	75,0
3	11	10	9,1
4	17	15	11,8
5	11	11	0,00
6	20	18	10,0
7	11	9	18,2
8	15	8	46,7
9	22	14	36,4
10	27	5	81,5
11	23	4	82,6
12	26	21	19,2
13	19	9	52,6
14	18	15	16,7
15	22	10	54,6
16	29	11	62,1
Total CV	308	166	46,1
Total CV/mL	192500	103750	46,1

Comparando os resultados da tabela 1 com os da tabela 2 observa-se que a percentagem de redução de células vivas, após a aplicação de ultrassons, aumentou de 46,1% para 64,5%. Verifica-se também que um dia após a inoculação (1º dia de fermentação) o número de células vivas é de 301.250, o que corresponde a um aumento de cerca de 56%, relativamente ao dia de inoculação de levedura onde o número de células inoculadas é 192.500. Uma vez que no processo de fermentação a levedura se multiplica transformando o açúcar da matriz branca em dióxido de carbono, é de esperar que, feita a contagem de células, esta apresente um valor mais elevado relativamente ao número de células vivas inoculadas na matriz branca (192.500). Após a aplicação de 1 minuto de ultrassons, verifica-se uma redução de 64,5%, o que representa 106.875 células vivas/mL.

Tabela 2- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 1 minuto.) e percentagem de redução, no primeiro dia da fermentação.

Nº quadrado	Células Vivas s/ U.S.	Células Vivas após 1 minuto de U.S.	% redução
1	25	2	92,0
2	30	4	86,7
3	33	10	69,7
4	23	15	34,8
5	34	11	67,7
6	27	18	33,3
7	43	14	67,4
8	32	8	75,0
9	28	14	50,0
10	26	5	80,8
11	31	4	87,1
12	28	21	25,0
13	21	9	57,1
14	27	15	44,4
15	28	10	64,3
16	46	11	76,1
Total CV	482	171	64,5
Total CV/mL	301250	106875	64,5

Os resultados presentes na tabela 3 correspondem à contagem de células vivas, antes da aplicação de ultrassons, e depois da aplicação destes com tempos de um minuto, dois minutos e três minutos, em três amostras, após a fermentação. Neste caso, subentende-se o final da fermentação três semanas após o início da mesma.

Analisando a tabela 3, verifica-se que a contagem feita antes da aplicação dos ultrassons conduz a um total de 201875 células vivas/mL. Comparando com a contagem feita no primeiro dia de fermentação (Tabela 2), esta apresenta uma redução de aproximadamente 33% em células vivas. Isto acontece porque, como se sabe, *a priori*, durante uma fermentação, a levedura cresce e multiplica-se, à medida que se vai alimentando dos açúcares da solução, libertando CO₂. Como é de esperar, há um pico onde se atinge um maior número de células vivas na solução (fase “log” ou exponencial).

Tabela 3- Número de células vivas da matriz branca, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempos de aplicação de 1, 2 e 3 minutos.) e percentagem de redução, no último dia da fermentação.

Nº quadrado	Células Vivas s/ U.S.	Células Vivas após 1 minuto de U.S.	Células Vivas após 2 minutos de U.S.	Células Vivas após 3 minutos de U.S.
1	29	25	8	14
2	11	22	13	22
3	30	25	16	9
4	24	22	27	17
5	16	22	23	15
6	28	24	10	22
7	20	33	6	11
8	13	23	13	16
9	14	28	9	34
10	26	22	18	13
11	18	27	11	17
12	16	37	13	25
13	18	34	25	21
14	26	20	14	19
15	18	18	14	13
16	16	28	9	26
Total CV	323	410	229	294
Total CV/mL	201875	256250	143125	183750

Após este máximo, alguma da levedura começa a sofrer lise, tendo tendência a diminuir o número de células vivas na mesma (fase estacionária e fase de morte). Assim sendo é de esperar que para o primeiro dia de fermentação o número de células vivas, antes de ser aplicado ultrassons, seja maior do que quando a levedura foi inoculada. A Figura 8 ilustra o exposto.

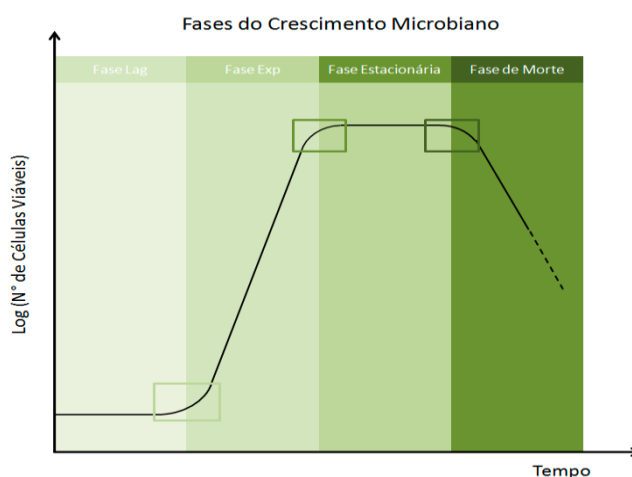


Figura 8- Figura representativa das quatro fases do crescimento microbiano [24].

Após uma incidência de um minuto de ultrassons, verificou-se que o número total de células vivas/mL é maior (256250) que o número de células vivas/mL na contagem efetuada

à amostra antes da aplicação de ultrassons (201875), o que nos mostra que os resultados não estão coerentes.

Relativamente ao número de células vivas na amostra após aplicação de dois minutos de ultrassons (143125) e comparando com a amostra sem ultrassons (201875), verificou-se que este decréscimo corresponde a uma redução de 29%.

Após se submeter a amostra a três minutos de ultrassons, verificou-se que o número de células vivas/mL é de 183750, o que representa uma redução de 9%.

Seria de esperar que à medida que se aumentasse os tempos de aplicação de ultrassons, o número total de células vivas/mL diminuísse. Os resultados apresentados não se encontram coerentes com o esperado. Dois dos motivos possíveis para tal ter acontecido são a eventual ocorrência de migração de células na leitura em câmara de Neubauer (ou resíduos na própria câmara) e um outro estará relacionado com a leitura da contagem de células.

Posteriormente, e na tentativa de se reduzir o tempo dos ensaios de fermentação (aumentado assim o número de ensaios), realizou-se um conjunto de ensaios cuja média dos resultados se apresentam na tabela 4.

A levedura foi inoculada e hidratada durante duas horas. Após hidratação procedeu-se à aplicação de ultrassons, para um tempo de 3 minutos. Ou seja, em comparação com a Matriz Branca - solução de água, levedura e açúcar - nestes ensaios trabalhou-se apenas com levedura hidratada (levedura+água).

Analisando a tabela 4, verifica-se que após o uso dos ultrassons o número total de células vivas é menor, o que pode ser provocado pela lise celular, ou seja, há uma quebra da parede celular da levedura. Assim sendo, de cada vez que os ultrassons são aplicados, a percentagem de células vivas diminuiu, consequentemente a percentagem de redução de células vivas aumenta. Assim, neste primeiro ensaio, e com um tempo de aplicação de três minutos, a percentagem de redução foi de 33%. Inicialmente a amostra apresenta-se com 521875 células vivas/mL passando para 348125 células vivas/mL após o uso dos ultrassons.

Tabela 4- Resultados obtidos para a contagem de células da levedura inoculada e hidratada durante 2h, antes e após a aplicação de Ultrassons (tempo de aplicação de 3 minutos).

Nº quadrado	Células Vivas s/ U.S.	Células Vivas Após 3 minutos de U.S.	% Redução
1	56	37	32,7
2	54	38	30,8
3	53	40	25,2
4	54	39	27,0
5	52	38	27,2
6	55	38	30,7
10	55	37	31,3
8	55	37	33,0
9	56	37	33,0
10	54	38	30,1
11	55	37	32,6
12	55	36	34,4
13	55	40	27,5
14	57	37	34,7
15	55	38	31,7
16	53	38	28,0
Total CV	873	605	30,7
Total CV/mL	545208	377917	

4.2. Análises físico-químicas ao vinho espumante

Na tabela 5, apresentam-se os resultados obtidos relativamente às análises físico-químicas feitas ao vinho espumante em estudo, antes da aplicação dos ultrassons.

Tabela 5- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH, para as amostras de vinho antes da aplicação de 3 minutos de Ultrassons.

Amostra	Acidez Total (g/L)	SO ₂ Livre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	pH
A1	4,25	21,8	183,1	3,49
A2	3,98	34,9	178,8	3,51
A3	4,08	21,9	180,2	3,55
A4	4,25	26,2	181,7	3,52
A5	4,13	26,2	184,6	3,50
A6	4,23	30,5	183,1	3,52

Na tabela 6, encontram-se os resultados das mesmas análises, mas após aplicação de ultrassons na amostra.

Tabela 6- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH, para as amostras de vinho depois da aplicação de 3 minutos de Ultrassons.

Amostra	Acidez Total (g/L)	SO ₂ Livre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	pH
A1	4,25	21,8	184,6	3,46
A2	3,75	34,9	177,3	3,44
A3	3,83	21,9	183,1	3,50
A4	4,25	26,2	181,7	3,78
A5	4,25	26,2	183,1	3,40
A6	4,28	30,5	184,6	3,49

Analisando os resultados presentes na tabela 5, quanto à acidez total, verifica-se que os valores estão compreendidos entre as 3,98 g/L e as 4,25 g/L. Quanto aos valores de SO₂

livre e total, os valores mínimos e máximos são, respetivamente de 21,8 e 178,8 mg/L e de 34,9 e 184,6 mg/L. Os valores de pH situam-se entre 3,49 e 3,55.

Analisando os resultados presentes na tabela 6, quanto à acidez total, verifica-se que os valores estão compreendidos entre as 3,75 g/L e as 4,28 g/L. Quanto aos valores de SO₂ livre e total, os valores mínimos e máximos são, respetivamente de 21,8 e 177,3 mg/L e de 34,9 e 184,6 mg/L. Os valores de pH situam-se entre 3,40 e 3,78.

A tabela 7 apresenta os valores médios de acidez total, SO₂ livre e total e pH. Da análise da mesma pode concluir-se que estes valores não são afetados pela aplicação dos ultrassons o que é positivo já que não altera estas características do vinho.

Tabela 7- Resultados relativos à acidez total (g/L), anidrido livre e total (g/L) e pH médios, para as amostras de vinho antes e após a aplicação de 3 minutos de Ultrassons.

	Acidez Total (g/L)	SO ₂ Livre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	pH
Amostra s/ U.S.	4,15	26,92	181,92	3,52
Amostra c/ U.S.	4,10	26,92	182,40	3,51

4.3. Tempo de aplicação ideal dos ultrassons nas amostras de vinho espumante

De modo a poder realizar-se o estudo da influência da temperatura inicial da amostra, bem como do seu volume, no processo de desgaseificação é necessário realizar um estudo prévio relativo ao tempo de aplicação. Para a determinação de qual o tempo ótimo de aplicação de ultrassons, foram testados um, dois, três, cinco, dez e vinte minutos de ultrassons. Os resultados dos ensaios revelaram-se pouco satisfatórios para tempos de aplicação superiores a três minutos. O volume da amostra utilizado foi de 50 mL.

Concluiu-se que o melhor tempo de aplicação, para estes ensaios, seria o de três minutos, uma vez que para este tempo as amostras apresentavam-se mais estáveis com pouco borbulhar e espuma reduzida. As Figuras 9, 10 e 11 ilustram o exposto.



Figura 9- Amostra de vinho 1 minuto de ultrassons.



Figura 10- Amostra de vinho 2 minutos de ultrassons.



Figura 11- Amostra de vinho aplicando 3 minutos de ultrassons.

De facto, como se pode verificar, através da análise das Figuras 9, 10 e 11 é para o tempo de três minutos que a amostra se apresenta mais estável e com menor formação de espuma. Uma vez que, para a escolha do tempo de aplicação, um dos critérios seria a estabilidade da amostra, face ao tempo que esta permaneceria nos ultrassons, o tempo escolhido foi o de três minutos.

4.4. Estudo da influência da temperatura inicial da amostra no processo de desgaseificação

Estando definido o tempo de aplicação do ultrassom nas amostras, foram realizados ensaios para testar o efeito da variação da temperatura inicial da amostra na desgaseificação.

Uma vez que um dos efeitos secundários do uso prolongado do ultrassom é o sobreaquecimento da ponta do mesmo, para além do registo do nível de desgaseificação, registou-se ainda a temperatura final da amostra. Isto porque a sujeição do vinho a elevadas temperaturas pode ter consequências indesejáveis.

Para o mesmo tipo de vinho espumante realizaram-se ensaios para cinco temperaturas iniciais: aproximadamente 10°C, 14°C, 16°C, 18°C e 20°C. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 12, 13, 14 e 15. As tabelas, com os resultados, que deram origem aos gráficos das Figuras 12 a 15, encontram-se em anexo (Anexo VI).

Iniciando a análise de resultados com a Figura 12 observa-se que, para um volume de 25 mL de amostra, o ótimo da desgaseificação dá-se para a temperatura de 16°C (29,7%).

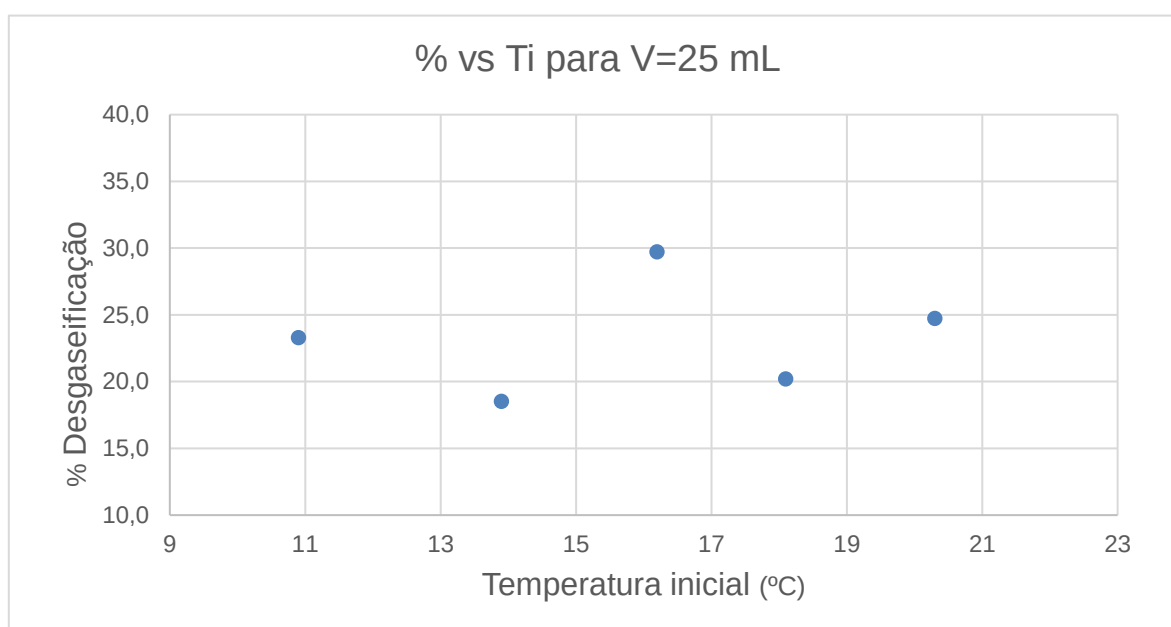


Figura 12- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 25 mL.

A Figura 13 ilustra os resultados obtidos para um volume de 50 mL. Da mesma retiramos que, para este volume de amostra, a variação da diferença da percentagem de CO₂ possui um comportamento oscilatório semelhante ao obtido anteriormente. Neste caso, o ponto máximo de desgaseificação foi para a temperatura de 20°C (51%).

A percentagem de desgaseificação é mais baixa para as temperaturas de 14°C e 18°C (33%), sendo que para as restantes temperaturas a percentagem encontra-se abaixo do ótimo (51%) de desgaseificação, mas superiores às percentagens obtidas nas temperaturas de 14°C e 18°C.

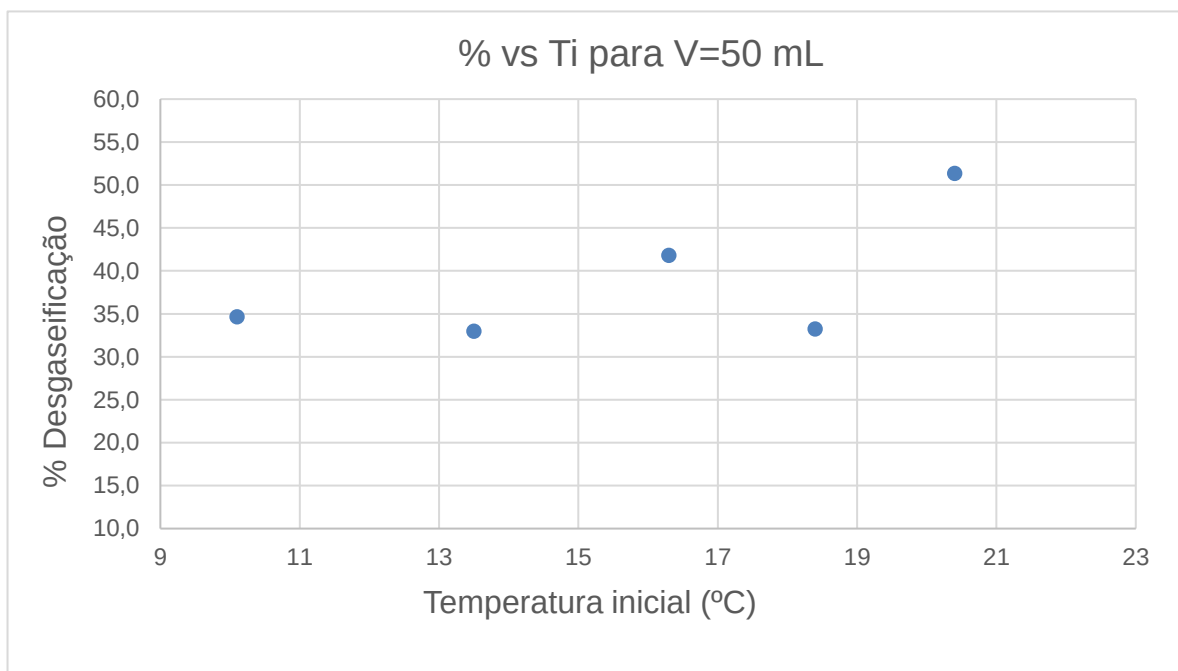


Figura 13- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 50 mL.

A Figura 14, apresenta os resultados obtidos para um volume de 75 mL. Observa-se que aumentado T_i aumenta também, gradualmente, a percentagem de desgaseificação das amostras. O valor máximo de desgaseificação para este volume dá-se, novamente, para uma temperatura de 16°C (34,3%).

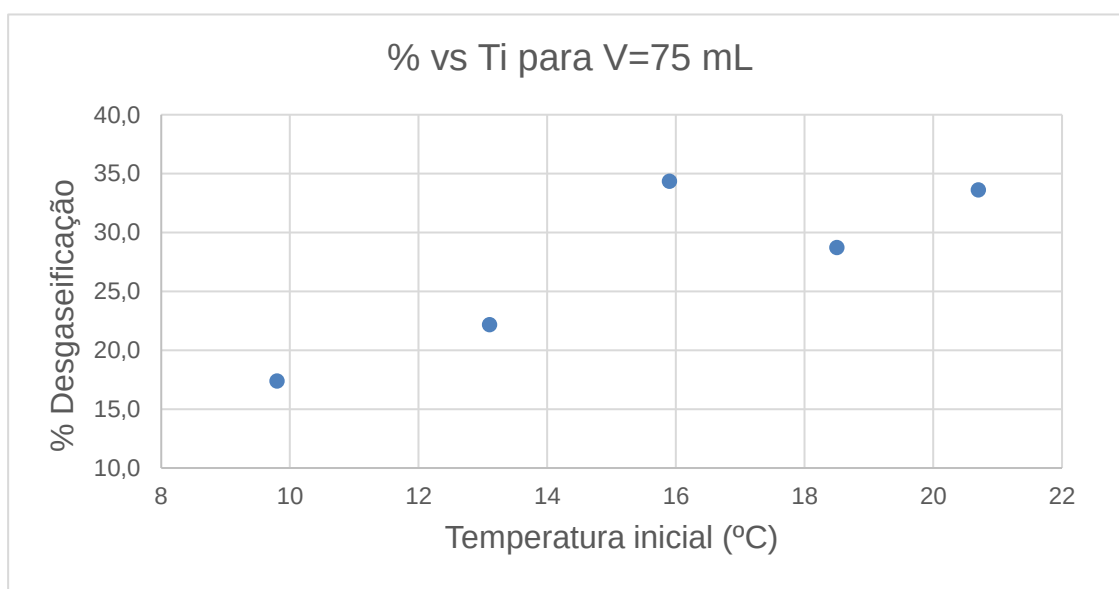


Figura 14- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 75 mL.

A percentagem de desgaseificação é mais baixa para a temperatura de 10°C (17,4%) e 14°C (22,2%), sendo que a temperatura que mais se aproxima do ótimo é a de 20°C.

Finalmente, para um volume de amostra de 100 mL, à medida que a T_i aumenta ocorre um aumento da percentagem de desgaseificação, das amostras. Para uma temperatura de 16°C, a percentagem de desgaseificação é máxima (33,3%), como se verifica através da análise da Figura 15.

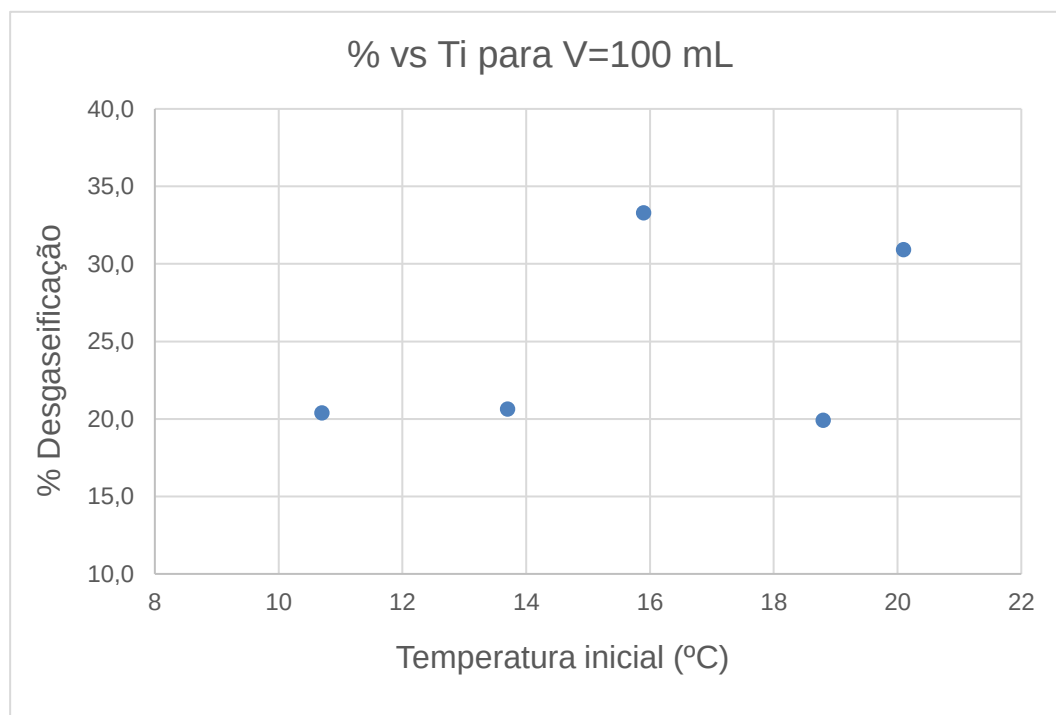


Figura 15- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 100 mL

A percentagem de desgaseificação é mais baixa para as temperaturas de 10°C (20,4%) e 18°C (19,9%), sendo que para as restantes temperaturas a percentagem encontra-se afastada do ótimo (34,3%) de desgaseificação, exceto a temperatura de 20°C (30,9%).

A Figura 16 apresenta um gráfico de dispersão associado aos resultados apresentados anteriormente.

Como pode observar-se o comportamento da desgaseificação em função da temperatura é bastante semelhante para todos os ensaios realizados com um pico situado perto dos 16°C, à exceção do ensaio para 50 mL.

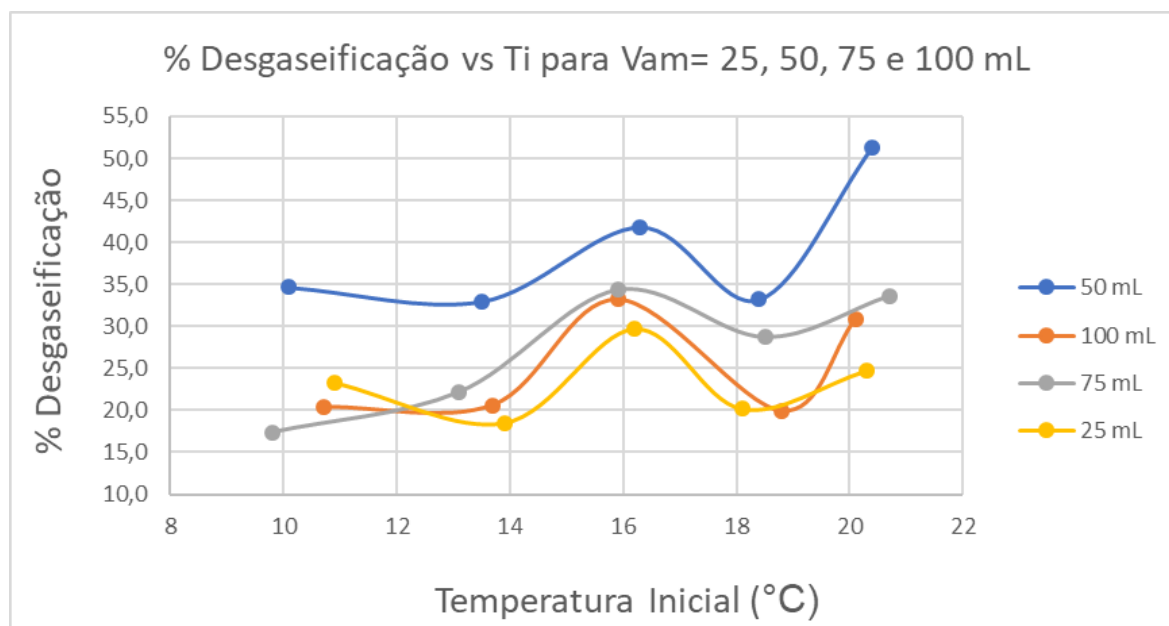


Figura 16- Percentagem de desgaseificação versus temperatura inicial das amostras. Volume de 25,50,75 e 100 mL.

Dado que a aplicação de ultrassons produz um aquecimento das amostras, o que pode ter consequências indesejáveis, para o vinho, apresentam-se de seguida, nas Figuras 17, 18, 19 e 20 os registos da temperatura final da amostra.

Fazendo uma análise ao gráfico da Figura 17, para um volume de amostra de 25 mL, verifica-se que para os vários valores de T_i , o valor de T_f é semelhante. Assim, para uma T_i igual a 10°C, o valor da T_f é de 50°C, e para uma T_i de 20°C, a T_f correspondente é de 52°C. Para os 18°C, a temperatura final foi mais baixa que as restantes, apresentando um valor de 43,8°C.

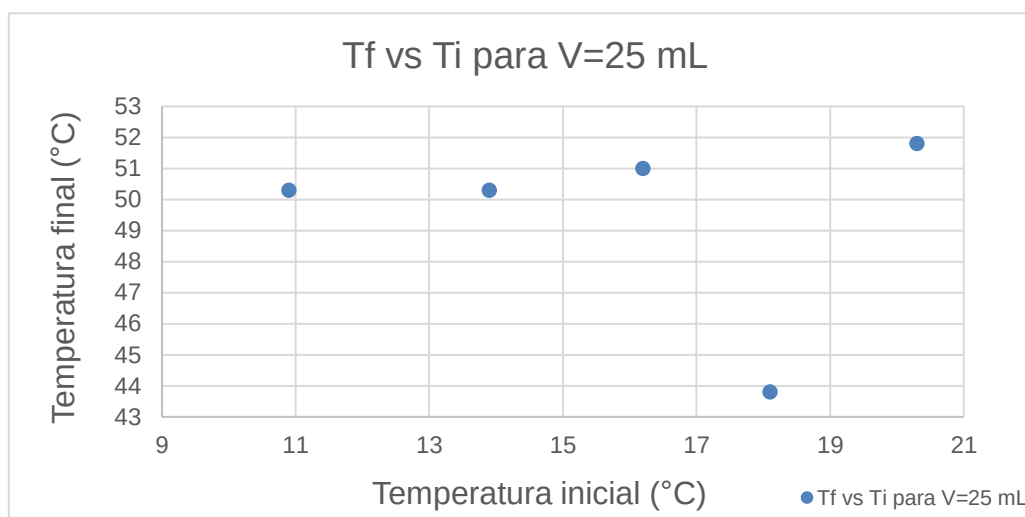


Figura 17- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 25 mL.

Efetuada a análise do gráfico da Figura 18, para um volume de amostra de 50 mL, verifica-se que a tendência é de a Tf aumentar consoante o aumento da Ti, à exceção de uma temperatura, que apresenta um valor mais baixo. Assim a temperatura final aumenta desde o valor de 23°C até 40,4°C baixando para 38,7°C para a temperatura inicial mais elevada.

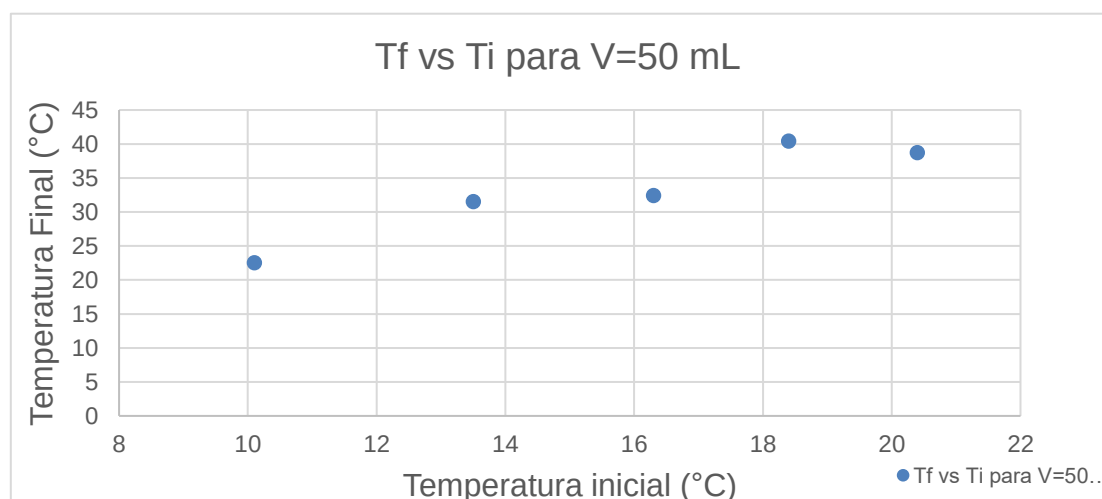


Figura 18- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 50 mL.

Analisando o gráfico da Figura 19, para um volume de amostra de 75 mL, verifica-se que quando a Ti aumenta de 10°C para 13°C, a Tf diminui, ao contrário do que se passa com as restantes Ti. Para uma Ti igual a 10°C, o valor da Tf é de 30°C, e para uma Ti de 13°C, a Tf correspondente é de 27°C. A partir de uma Ti igual a 16°C, as Tf aumentam à medida que a Ti aumenta também.

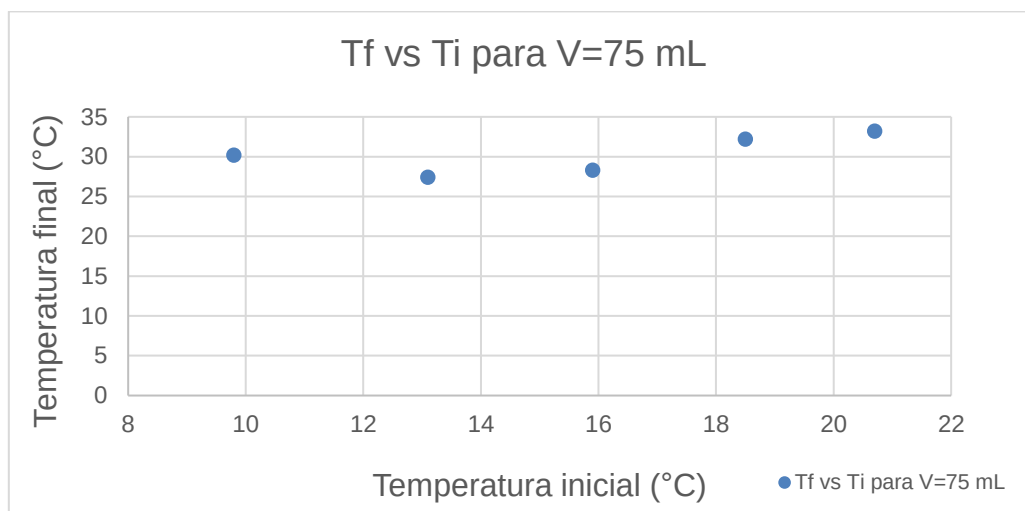


Figura 19- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 75 mL.

Efetuada a análise do gráfico da Figura 20, para um volume de amostra de 100 mL, verifica-se que a tendência é de a Tf aumentar consoante o aumento da Ti. Para uma Ti igual a 10°C, o valor da Tf é de 23°C. Para uma Ti igual a 20°C o seu valor correspondente de Tf é de 30°C.

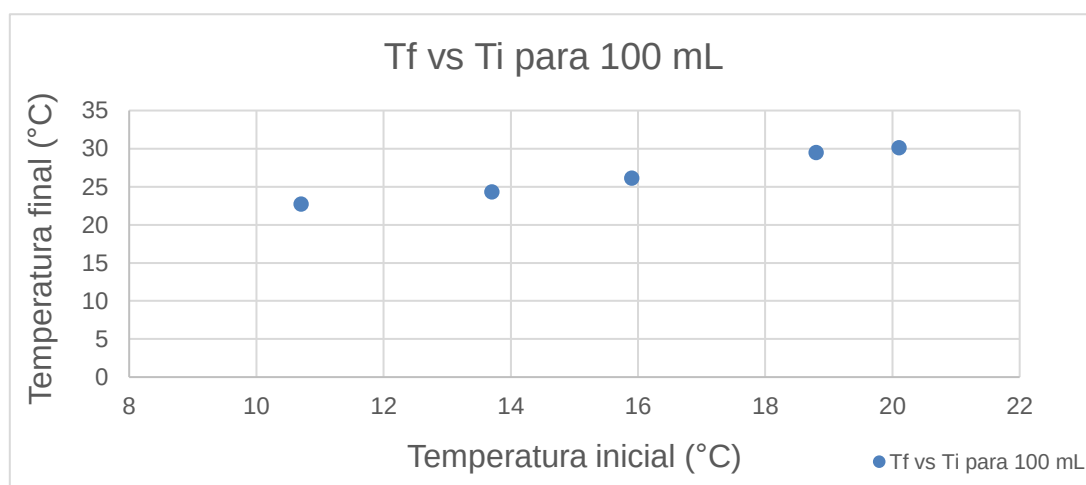


Figura 20- Temperatura final versus temperatura inicial das amostras. V= 100 mL.

Da análise das figuras 17 a 20 pode concluir-se que para volumes de amostra inferiores a 50 mL a temperatura final da amostra é elevada (cerca de 50°C). No entanto para os restantes volumes (50, 75 e 100 mL) a temperatura final decresce exponencialmente apresentando valores médios de, respetivamente, 33, 30 e 27°C.

4.5. Estudo da influência do volume de amostra no processo de desgaseificação

Após a definição do tempo de aplicação do ultrassom nas amostras, e avaliada qual a influência das variações de temperatura, foram realizados ensaios para verificar o efeito do volume de amostra na desgaseificação da mesma. Sendo que estes ensaios são realizados à escala laboratorial, os mesmos irão ajudar a prever se algo semelhante irá decorrer em escala industrial. Para o mesmo tipo de vinho espumante realizaram-se ensaios para quatro volumes de amostra: 25 mL, 50 mL, 75 mL, e 100 mL. Os resultados obtidos encontram-se nos gráficos das Figuras 21, 22, 23, 24. e 25. As tabelas, com os resultados, que deram origem aos gráficos das Figuras 21 a 25, encontram-se em anexo (Anexo VII).

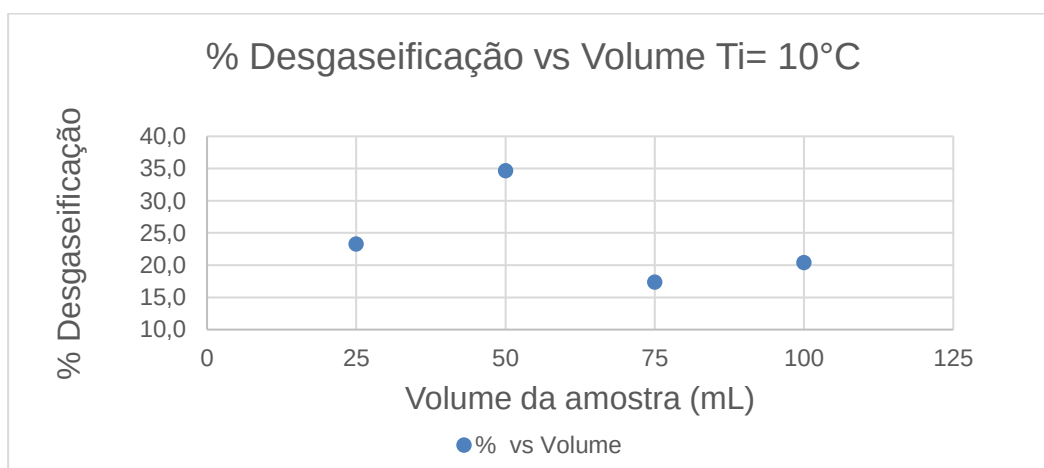


Figura 21-Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 10^\circ\text{C}$.

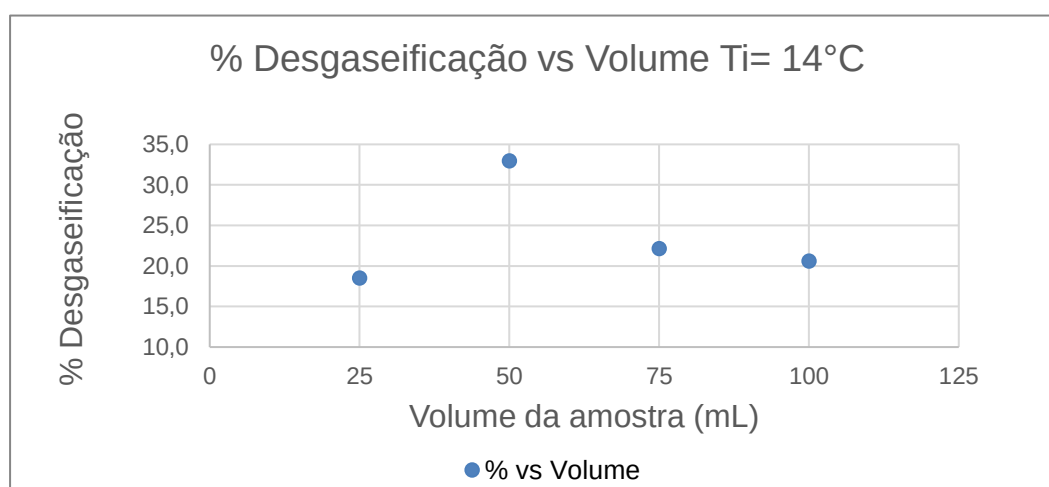


Figura 22- Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i = 14^\circ\text{C}$.

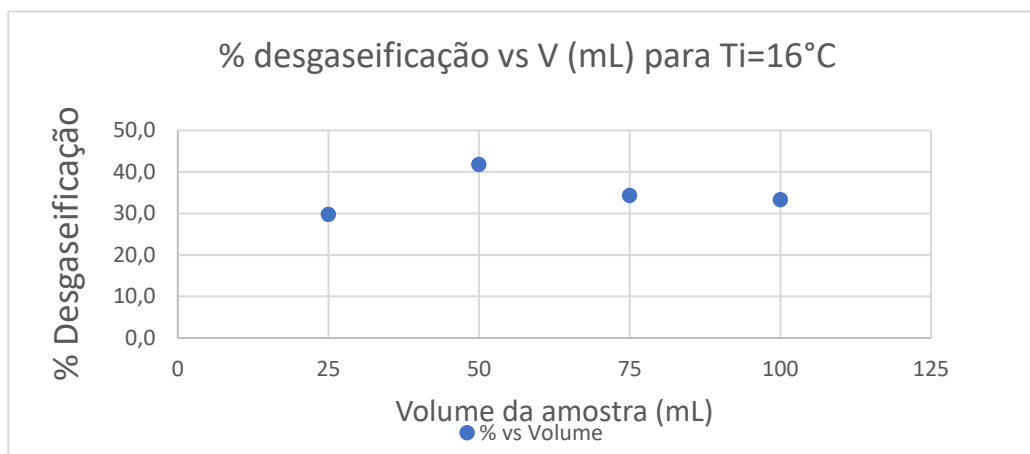


Figura 23-Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i= 16^\circ\text{C}$.

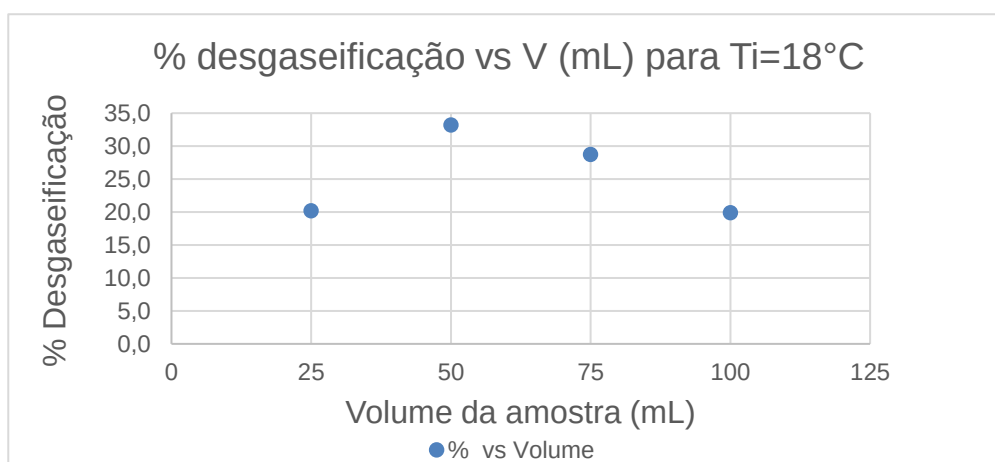


Figura 24-Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i= 18^\circ\text{C}$.

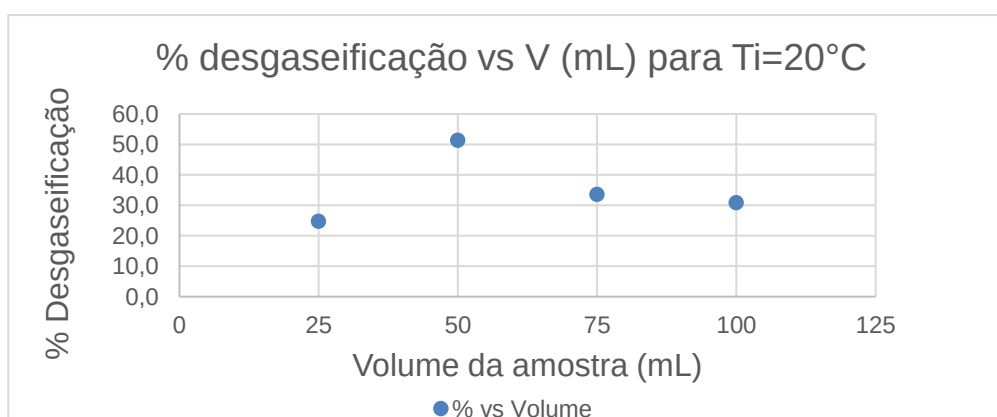


Figura 25-Gráfico da percentagem de desgaseificação versus o volume de amostra (mL), para $T_i= 20^\circ\text{C}$.

Observando os gráficos das Figuras 21 a 25, para T_i de 10°C , 14°C , 16°C , 18°C e 20°C , verifica-se que passando dos 25 mL de amostra para os 50 mL, há um aumento da desgaseificação. É de relembrar que a otimização do tempo de aplicação dos ultrassons na amostra foi feita para 50 mL. À medida que se aumenta o volume de amostra, a desgaseificação diminui. Estes resultados podem dever-se ao facto de o tempo de aplicação ter sido otimizado para 50 mL. Assim, para volumes menores este tempo é suficiente para a desgaseificação da amostra, mas para volumes superiores a 50 mL deveria utilizar-se um tempo de aplicação superior.

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

Neste trabalho, o principal objetivo foi a verificação da influência dos ultrassons durante o processo da produção de vinho, bem como no produto final.

O estudo inicial baseou-se na análise da influência que os ultrassons teriam durante a fermentação do vinho. Assim, realizaram-se ensaios usando uma Matriz Branca. Tal permitiu simular uma fermentação que duraria um máximo de três semanas. O volume de líquido colocado a fermentar foi de 3L, sendo que as amostras recolhidas para análise foram todas de 50 mL. Neste caso, realizou-se um estudo para três diferentes tempos de aplicação de ultrassons: 1, 2 e 3 minutos.

Com a realização destes ensaios foi possível concluir que efetivamente os ultrassons apresentam-se como destrutivos para a levedura, provocando a sua lise celular, o que faz com que esta morra. De facto, uma das conclusões que se podem retirar através da análise dos resultados é que o uso de ultrassons, seja em que tempo for, reduz significativamente o número total de células vivas. Seria de esperar que quanto maior fosse o tempo de aplicação, menor seria o número de células vivas totais. Tal não se verificou nos resultados obtidos. Como causas possíveis, para tal ter acontecido, aponta-se a ocorrência de migração de células na leitura em câmara de Neubauer (ou resíduos na própria câmara) ou erro de leitura na contagem das mesmas.

Como o principal objetivo do estudo nesta fase seria concluir se os ultrassons poderiam, ou não, ser usados durante a fermentação, a conclusão retirada é que não se podem usar, pelo menos numa escala tão pequena como esta. Uma vez que as percentagens de redução das células vivas/mL rondam os 30% (valor promissor mas, no entanto, reduzido), conclui-se que efetivamente os ultrassons não poderão ser usados como meio para interromper uma fermentação. No entanto, poderão ser usados como meio de aceleração do processo de *bâtonnage*. Como tal, se for possível a aceleração deste processo, como vantagens teremos a diminuição de custos por otimização da logística do processo de produção, a diminuição do tempo de operação unitário, provavelmente poder-se-á evitar que o vinho sofra alterações na sua composição, (o que aconteceria usando por exemplo, uma *bâtonnage* forçada) com a adoção de medidas de controlo de temperatura no processo.

Seguidamente ao estudo da fermentação, procedeu-se à realização de ensaios para contagem de células. Para tal usou-se uma levedura que hidratou durante duas horas (sem dar início à fermentação). Conclui-se que, mais uma vez, a aplicação dos ultrassons reduz o número total de células vivas presentes naquele meio.

Numa segunda fase do estudo, avaliou-se a influência dos ultrassons no produto final, ou seja, num VEQ Rosé Bruto. Esta fase encontra-se dividida em 3 diferentes etapas.

A primeira etapa, serviu para se otimizar o tempo de aplicação dos ultrassons na amostra. Assim sendo, foram realizados ensaios para volumes de amostra de 50 mL e uma temperatura inicial de 20°C, usando-se tempos de aplicação compreendidos entre um e três minutos. Após análise visual dos resultados, concluiu-se que as amostras apresentavam uma maior estabilidade usando-se um tempo de aplicação de três minutos.

Na segunda etapa, estudou-se qual seria a influência da temperatura inicial da amostra, no processo de desgaseificação.

Analisando os resultados obtidos, pode concluir-se que para um volume de 25, 75 e 100 mL de amostra, o ótimo da desgaseificação dá-se a uma temperatura de 16° C, com valores de 29,7%, 34,3% e 33,3%, respetivamente.

Para um volume de amostra de 50 mL, quanto maior for a T_i , a diferença da percentagem de CO_2 tem tendência a diminuir ligeiramente. Neste caso, o ótimo de desgaseificação deu-se para uma temperatura de 20°C (51,4%).

Nos volumes de amostra de 75 e 100 mL, aumentado a T_i aumenta também, gradualmente, a percentagem de desgaseificação das amostras.

Globalmente, da análise da Figura 16, pode dizer-se que o ponto máximo de desgaseificação ocorre maioritariamente para uma temperatura inicial de 16° C.

Fazendo uma análise aos resultados obtidos para T_f vs T_i , para um volume de amostra de 25 mL, verifica-se que para todos os valores de T_i , a tendência será de T_f ser semelhante.

Num volume de amostra de 50 mL, verifica-se que a tendência é de a T_f aumentar consoante o aumento da T_i , à exceção de duas temperaturas, que apresentam valores mais baixos.

Para um volume de amostra de 75 mL, verifica-se que para valores de T_i compreendidos entre os 10°C e os 13°C, a T_f diminui, comparativamente às restantes T_i . A partir de uma T_i igual a 16°C, as T_f aumentam à medida que a T_i aumenta também.

Quando o volume de amostra é de 100 mL, verifica-se que a tendência é de a T_f aumentar consoante o aumento da T_i .

Desta fase do estudo conclui-se ainda que a temperatura final decresce para os volumes de 25, 50, 75 e 100 mL, apresentando valores médios de, respetivamente, 49, 33, 30 e 27°C.

Após definido o tempo de aplicação do ultrassom nas amostras, e avaliada qual a influência das variações de temperatura, para a terceira, e última, etapa fez-se um estudo de forma a inferir, se o volume de amostra iria ter influência na desgaseificação da mesma. O estudo foi feito para 4 volumes de amostra diferentes: 25 mL, 50 mL, 75mL e 100 mL.

Analisando os resultados obtidos, para T_i de 10°C, 14°C, 16°C, 18°C e 20°C, verifica-se que passando dos 25 mL de amostra para os 50 mL, há um aumento da desgaseificação. É de salientar que a otimização do tempo de aplicação dos ultrassons na amostra foi feita para 50 mL. À medida que aumentamos o volume de amostra, a desgaseificação diminui, o que pode dever-se ao facto de como o tempo foi otimizado para 50 mL, para volumes menores este é suficiente para desgaseificar a amostra, mas para volumes superiores a 50 mL, não o será.

Como conclusão geral, é possível a desgaseificação do vinho através da utilização de ultrassons. Verifica-se uma redução na percentagem de CO_2 (aproximadamente 30%), o que torna o processo de colocação do vinho no mercado mais rápido, do que se se usasse o método tradicional para libertação de CO_2 nele contido.

5.1. Trabalhos futuros

Como trabalhos futuros seria interessante determinar quais os tempos ótimos de aplicação para os diferentes volumes utilizados nos ensaios. Seria de igual forma interessante um estudo relacionado com o envelhecimento do vinho, bem como a extração de cor do mesmo.

Medição da libertação de etanol, durante o decorrer das fermentações, sendo possível através deste a verificação da atividade da levedura.

Utilização de um contador de células automático, como por exemplo o Luna II YF.

Efetuar uma análise económica, realizando-se uma análise de custos para a verificação de, se a uma escala piloto/industrial, compensará este tipo de estudo.

A utilização de diferentes frequências e intensidades ultrassónicas seria também um ponto interessante de análise.

A realização de um estudo, utilizando-se os métodos tradicionais durante o processo de produção de vinho (exemplo, Bâttonage tradicional), sendo assim possível de se efetuar a comparação com o estudo em causa (uso de técnicas de ultrassons).

Finalmente, para ensaios com diferentes volumes e diferentes tempos ótimos de aplicação, poderão levar à determinação da influência conjunta destes dois parâmetros: Temperatura inicial e Volume da amostra.

Bibliografia

- [1] “Máquinas e Acessórios para Enologia/Empresa: TRATIVI,” [Online]. Available: (<http://trativi.com/pt>). [Acedido em 21 Abril 2018].
- [2] A. Santos, D. Lourenço, S. Ferreira, N. Pita e A. Cabete, “Ondas de ultrassons,” Escola Superior Agrária de Coimbra, Coimbra, 2010.
- [3] R. dos Santos Oliveira, J. da Silva Rocha e C. e. a. Eduardo Barão, “Brazilian Journal of Research,” *Aplicação de processo ultrassom na extração de catequinas dos resíduos de chá verde*, 2016.
- [4] L. Dos Santos Sousa, “Extração e Purificação de Compostos Fenólicos presentes nas folhas de Camelia Sinensis,” Uberlândia, 2016.
- [5] A. e. a. Castro Alves Ferreira Filho, *APLICAÇÃO DO ENSAIO DE ULTRASSOM NA INDÚSTRIA AERONÁUTICA*, 2014.
- [6] R. Isabel Nogueira, “Uso de ultrassom na conservação de alimentos,” 2010.
- [7] “Clube Vinhos Portugueses,” 23 Abril 2018. [Online]. Available: <https://www.clubevinhosportugueses.pt/uncategorized/historia-do-vinho/>.
- [8] “História do Vinho,” Wikipedia, Outubro 2016. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Hist%C3%B3ria_do_vinho#cite_ref-0_1-1. [Acedido em 11 Novembro 2019].
- [9] “Infoescola,” [Online]. Available: <https://www.infoescola.com/curiosidades/historia-do-vinho/>. [Acedido em 23 Abril 2018].
- [10] Infovini, “Infovini,” INEGI/Mercatura, [Online]. Available: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=23&codEsquema=1>. [Acedido em 15 Maio 2018].

- [11] V. S. Sogrape, 2019. [Online]. Available: https://www.sograpevinhos.com/enciclopedia/guia_vinho/vinificacao/espumantes.
- [12] “AZ3 Oeno Enologia Viva,” AZ3 Oeno S.L., [Online]. Available: <https://www.az3oenop.pt/processos/brancos-e-rosados/batonage/>. [Acedido em 8 10 2019].
- [13] Infovini, “Infovini Beta - O portal do Vinho Português,” INEGI/Mercatura, 2009. [Online]. Available: <http://www.infovini.com/pagina.php?codNode=18009>.
- [14] C. d. U. Europeia, “Jornal Oficial da União Europeia,” *Regulamentos*, 25 Maio 2009.
- [15] T. P. M. Mason, “Ultrasound in Food Processing,” 2005.
- [16] wikipedia, “Ultrassonografia,” 17 Dezembro 2017. [Online]. Available: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ultrassonografia>. [Acedido em 11 Novembro 2019].
- [17] “Industrial applications of high power ultrasonics in the food, beverage and wine industry,” *Bates, D. ; Patista, A. , 2008*.
- [18] R. N. S. A. M. A. F.-T. A. A.-V. M. Chemat F., “Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.,” 2017.
- [19] H. —. U. Technology, “Sonication of Wine – Innovative Applications of Ultrasound in Wineries,” Hielscher – Ultrasound Technology , 1999-2019. [Online]. Available: <https://www.hielscher.com/sonication-of-wine-innovative-applications-of-ultrasound-in-wineries.htm>. [Acedido em 5 Março 2019].
- [20] Z. Izadifar, P. Babyn e D. Chapman, *Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge*, vol. 43, pp. 1085-1104, Junho 2017.
- [21] J. O. d. U. Europeia, “REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 DA COMISSÃO de 10 de Julho de 2009,” *REGULAMENTOS*, 10 Julho 2009.
- [22] A. Curvelo Garcia, *Controlo da qualidade em Enologia*, 2017.

- [23] D. Ursula Mehnert, "Culturas celulares e a sua aplicação," São Paulo, Brasil.
- [24] A. Tessarollo, A. de Oliveira Coiradas, L. Rodrigues Teixeira, M. Kostecki e T. Miura, "Wiki AIA 13-17," [Online]. Available: https://aia1317.fandom.com/pt-br/wiki/Crescimento_bacteriano_e_meios_de_cultura.
- [25] T. Mason, J. Lorimer e L. Paniwnyk, *The uses of ultrasound in food technology - Ultrasonics Sonochemistry*, vol. III, pp. 253-260, 1996.

Anexos

Anexo I

Determinação da Acidez Total

Reagentes

- Solução N/10 de hidróxido de sódio (NaOH)
- Azul de bromotimol 4g/L

Equipamento/Material

- Erlenmeyer de 300 mL
- Bureta Digital
- Pipetas de 1 e 10 mL

Modo Operatório

- Pipetar 30,00 mL de água fervida para um matraz. Adicionar 10,00 mL da amostra;
- Pipetar cerca de 1 mL de azul bromotimol e titular com a solução de NaOH até à obtenção de uma cor azul esverdeada;
- Seja V em mL, o volume de solução de NaOH gasto.

Expressão de Resultados

A acidez total expressa em gramas de ácido tartárico por litro, será:

$$AT = 0,075 \cdot V_{g \text{ NaOH}}$$

A acidez total, expressa em miliequivalentes por litro, será:

$$AT = 10 \cdot V_{g \text{ NaOH}}$$

Anexo II

Determinação do Anidrido Sulforoso Livre e Total

Reagentes

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), solução a $\frac{1}{4}$ (v/v);
- Solução de amido a 5 g/L;
- Solução de iodo a 4 g/L;

Equipamento/Material

- Erlenmeyer de 500 mL;
- Bureta Digital;
- Pipeta de 50 mL.

Modo Operatório

- Anidrido Sulforoso Livre E Total (SO_2 livre e SO_2 Total)

Para um Erlenmeyer de 500 mL, pipetar 50 mL da amostra e adicionar 5 mL de H_2SO_4 e cerca de 2 mL de solução de amido. Titular imediatamente com a solução de iodo até que se observe uma coloração azul-arroxeadado, sendo V em ml o volume de iodo utilizado.

Expressão de Resultados

A solução-padrão de iodo deve ter uma concentração igual a 0,02 N (0,01 M ou 2,538 g/l).

Uma vez que o iodo reage com o SO_2 numa proporção de 1:1 então 1 equivalente de iodo (253,8 g) reage com 1 equivalente de SO_2 (64 g) e, portanto:

$$2,538 \text{ g de iodo} \Leftrightarrow 0,64 \text{ g de SO}_2$$

$$2,538 \text{ g/l de iodo} \Leftrightarrow 0,64 \text{ g/l de SO}_2$$

$$2,538 \text{ g/l de iodo} \Leftrightarrow 0,64 \text{ mg/ml de SO}_2$$

logo, a quantidade (massa) de anidrido sulfuroso que reage por ml de solução de iodo adicionada é igual a 0,64 mg. O valor da concentração de anidrido sulfuroso livre é, então, dado através da seguinte fórmula:

$$C_{\text{SO}_2} = V \times 0,64 \times 40 \text{ mg/L}$$

O que corresponde a LQ = $C_{\text{SO}_2} = V \times 25,6$ segundo a Norma Portuguesa NP 2220/1987.

C – Concentração de SO_2 em mg/l

V – Volume da solução de iodo 0,02 N gasta na titulação (em ml)

0,64 – Massa de SO_2 que reage com 1 ml de solução de iodo 0,02 N (em mg)

40 – Fator utilizado para calcular a quantidade total de SO_2 existente por litro de vinho

Os resultados são normalmente expressos em mg/l, arredondados às unidades. Como no nosso caso a solução de iodo apresenta uma concentração de $4 \text{ g/L} \cong 0,032 \text{ mol/L}$, temos então que:

$$4 \text{ g de iodo} \Leftrightarrow 1,09 \text{ g de SO}_2$$

$$4 \text{ g/l de iodo} \Leftrightarrow 1,09 \text{ g/l de SO}_2$$

$$4 \text{ g/l de iodo} \Leftrightarrow 1,09 \text{ mg/ml de SO}_2$$

$$\text{Logo, } C = V \times 1,09 \times 40 \text{ mg/L}$$

Anexo III

Determinação do pH

Equipamento, Material e Reagentes

- Eléctrodo;
- Agitador magnético;
- Barra magnética;
- Gobelé 50 mL;
- Solução padrão pH 4;
- Solução padrão pH 7;

Modo operativo:

Calibração

1) Calibrar o eléctrodo com as soluções padrão pH 4 e pH 7, seguindo as instruções dadas pelo fornecedor;

Nota: A calibração deve ser realizada diariamente.

Leitura do pH da amostra

- 1) Ligar o equipamento (medidor de pH);
- 2) Limpar convenientemente o eléctrodo com água desionizada e secar;
- 3) Colocar o gobelé com a solução a analisar. Introduzir a barra magnética (para agitação da solução);

Anexo IV

Determinação do Dióxido de Carbono

Equipamento, Material e Reagentes

- Placa de Agitação;
- Medidor de pH;
- Solução de hidróxido de sódio, 0,1 M;
- Solução de ácido sulfúrico, 0,05 M;
- Solução de anidrase carbónica, 1 g/L;
- Matrizes 250 mL;
- Pipetas Volumétricas;
- Pipetas de Pasteur;
- Gobelés.

Modo Operatório

- 1) Para as amostras:
 - Marque o nível de vinho na garrafa e deixar esfriar até se iniciar o congelamento;
 - Retirar do frio e deixar a garrafa aquecer ligeiramente, agitando até que os cristais de gelo desapareçam;
 - Remova a tampa rapidamente e coloque 45 a 50 mL de vinho num gobelé para titulação em branco. O volume exato removido, v mL, é determinado pela leitura num balão volumétrico, à temperatura ambiente;
 - Imediatamente após a remoção da amostra em branco, adicionar 20 mL da solução de hidróxido de sódio para uma garrafa de 750 mL;
 - Deixe o vinho atingir a temperatura ambiente;
 - Colocar 30 mL de água destilada fervida e duas gotas da solução de anidrase carbónica num matraz de 250 mL. Adicionar 10 mL de vinho alcalinizado;
 - Colocar o matraz no agitador magnético, ligando a agitação moderadamente;
 - Titular com a solução de ácido sulfúrico, 0,05 M, lentamente até o pH atingir 8,6. Observe a leitura da bureta.
 - Continuar até que o pH atinja 4,0. Seja n mL o volume adicionado entre pH 8,6 e 4,0.

2) Para o ensaio em branco:

- Remover CO₂ do v mL de vinho colocado de lado para a titulação em branco por agitação numa placa durante três minutos.
- Remover 10 mL de vinho descarbonatado e adicionar a 30 mL de água destilada fervida, adicionar duas a três gotas de solução de hidróxido de sódio, 50%, para fazer o pH subir para 10 a 11. Em seguida, seguir o procedimento acima mencionado. Seja n' mL o volume de ácido sulfúrico adicionado, 0,05 M.

Expressão dos resultados

1 mL de ácido sulfúrico, 0,05 M, corresponde a 4,4 mg de CO₂. Esvaziar a garrafa de vinho alcalinizado e determinar com um volume inicial de 1 mL de vinho, perfazendo até a marca com água, digamos V mL. A quantidade de CO₂ em gramas por litro de vinho é dada pela seguinte fórmula:

$$0,44 \cdot (n - n') \cdot \frac{V - v + 20}{V - v}$$

A percentagem de redução, absoluta, foi calculada através da seguinte expressão:

$$\frac{CO2\ inicial - CO2\ final}{CO2\ inicial} \cdot 100$$

Anexo V

Contagem de células em câmara de Neubauer

Preparação da câmara de Neubauer

- Lavar a câmara de Neubauer água. Secar e depois lava-se com álcool a 70 % e em seguida seca-se com o papel. Recorre-se ao mesmo procedimento para a lamela.

Observação importante: Deve-se sempre lavar a câmara e a lamela após cada leitura, para se efetuar novas leituras ou quando se for guardá-las.

- Depois, passa-se saliva com o dedo nas duas laterais das câmaras para facilitar a fixação da lamela. Em seguida deve-se fixar a lamela sobre a câmara, pressionando levemente com os polegares a lamela, fazendo pequenos movimentos para cima e para baixo até a sua fixação.

Obs: Para se certificar que a lamela esta devidamente fixa na câmara, inclina-se esta deixando-a verticalmente alinhada a bancada de trabalho; se não cair é porque esta bem fixa.

Colocação da amostra para contagem na Câmara de Neubauer

- Com uma pipeta de Pasteur, deposita-se a amostra cuidadosamente entre a câmara e a lamínula tendo cuidado de forma a preencher totalmente o volume da câmara, mas sem deixar vazar e/ou cair amostra sobre a lamínula.
- Após a colocação da amostra na câmara aguarda-se um momento para que haja a sedimentação das células e procede-se a contagem ao microscópio. Geralmente é mais fácil de visualizar as leveduras com a objetiva de 40 X.

Obs: Caso seja necessário, pode-se melhorar a visualização das células utilizando algumas gotas de corantes como o cristal violeta ou azul de metileno na água a ser utilizada na diluição da amostra em análise.

- Para leveduras e bactérias, a melhor escolha para trabalhar são os quadrantes “A”, sendo que a contagem é viável, ou seja, a contagem é facilitada quando há de 8 - 20 células em cada um dos 16 quadrados deste quadrante.

Leitura e Determinação da concentração de células na Câmara de Neubauer

Para leveduras é aconselhável utilizar os quadrantes “A” da câmara de Neubauer. Vimos que existem 4 quadrantes “A” iguais na câmara e pode-se optar por fazer a contagem em qualquer um deles. Uma maior precisão pode-se obter contando todas as áreas “A” na câmara e depois tira-se a média.

Para efetuar a contagem e células vivas, vem que:

$$CV/mL = \frac{\text{Soma das CV dos 16 quadrantes}}{16} * Fd$$

Anexo V

Preparação da Matriz Branca

Materiais:

- Reator
- Gobelé 100 ml
- Balança
- Vareta
- Leveduras liofilizadas – *Saccaromyces Cerevisae*
- Nutriente de fermentação
- Matriz de mosto: Solução de açúcar invertido a 20°Brix => 193 g açúcar/L

Procedimento:

- Água a entre 38°C e 40°C;
- Dispersar as leveduras liofilizadas na lâmina de água, com cuidado para não formar grumos e existir o máximo de área de levedura em contacto com a água;
- Aguardar 20-30 minutos;
- Misturar a solução de açúcar invertido na água para reduzir a temperatura em 10°C => para 28°C;
- Inocular na matriz de mosto no reator.

Segundo este protocolo as leveduras irão hidratar e iniciar o processo de multiplicação e fermentação. De forma a que a matriz branca seja a mais aproximada do processo de vinho, devem permitir-se que as leveduras efetuem a fermentação da solução de açúcar invertido até ao fim, processo esse que pode demorar uma a duas semanas dependendo da temperatura de controlo de fermentação (recomendado controlo a 17°C).

A hidratação e inoculação de leveduras é efetuada segundo os seguintes parâmetros:

- Inoculação: 30 gr leveduras / Hectolitro de mosto.
- Hidratação: hidratar as leveduras em 10 vezes o seu peso em água.

Anexo VI

Ensaio para o estudo da influência da temperatura inicial da amostra no processo de desgaseificação

Tabela 8- Resultados relativos ao cálculo do n' (diferença de volumes), no ensaio em branco.

Vi,b (mL)	V1 (mL)	V2 (mL)	pHi	pH1	pH2	Vg1	V2	n'
0,3	8,9	15,3	12,05	8,59	4,07	8,6	15,3	6,7

Tabela 9- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos), para o cálculo do CO₂ inicial.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
50	20,3	27,5	7,2	3
50	20,3	27,5	7,2	3
50	20,3	27,5	7,2	3

Tabela 10- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação inicial (na garrafa). Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,5	8,5	35,7	10,12	8,64	4,04
0,4	8,6	35,8	10,1	8,39	4
0,5	8,6	35,8	10,11	8,58	4,02

Tabela 11- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação do CO₂ inicial na garrafa, em amostras com um volume de 50 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ inicial (g/L)	% CO ₂
1	8	35,7	27,7	6,7	700	50	9,524	0,952
2	8,2	35,8	27,6	6,7	700	50	9,479	0,948
3	8,1	35,8	27,7	6,7	700	50	9,524	0,952
						Média	9,509	0,951

Tabela 12- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3

Tabela 13-Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,3	10,7	30,8	10,02	8,6	4,04
0,4	10,9	31,2	10,48	8,6	4
0	11	30,9	10,41	8,59	4,03
0,1	11	30,8	10,15	8,58	4,04
0,4	10,7	31,3	10,36	8,65	4
0,2	10,9	30,9	10,38	8,62	4,01
0,4	10,7	30,9	10,38	8,62	4,01
0,1	10,4	31	10,33	8,58	4,03

Tabela 14-Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 10°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ inicial (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂	Delta % CO ₂
1	10,4	30,8	20,4	6,7	700	50	9,509	6,213	0,621	0,951	0,330
2	10,5	31,2	20,7	6,7	700	50	9,509	6,350	0,635	0,951	0,316
3	11	30,9	19,9	6,7	700	50	9,509	5,987	0,599	0,951	0,352
4	10,9	30,8	19,9	6,7	700	50	9,509	5,987	0,599	0,951	0,352
5	10,3	31,3	21	6,7	700	50	9,509	6,486	0,649	0,951	0,302
6	10,7	30,9	20,2	6,7	700	50	9,509	6,123	0,612	0,951	0,339
7	10,3	30,9	20,6	6,7	700	50	9,509	6,304	0,630	0,951	0,321
8	10,3	31	20,7	6,7	700	50	9,509	6,350	0,635	0,951	0,316

Tabela 15- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
50	13,5	31,5	18	3
50	13,5	31,5	18	3
50	18,4	40,4	22	3
50	18,4	40,4	22	3

Tabela 16- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,5	8,6	29,1	10,37	8,51	4,04
0,3	8,7	28,9	10,35	8,5	4,02
0,8	10,1	30,1	10,34	8,56	4,01
0,1	9,3	29,8	10,35	8,56	4,02

Tabela 17- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 13°C e 18°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ inicial (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Delta % CO ₂
1	8,1	29,1	21	6,7	700	50	9,509	6,486	0,649	0,951	0,302
2	8,4	28,9	20,5	6,7	700	50	9,509	6,259	0,626	0,951	0,325
3	9,3	30,1	20,8	6,7	700	50	9,509	6,395	0,639	0,951	0,311
4	9,2	29,8	20,6	6,7	700	50	9,509	6,304	0,630	0,951	0,321

Tabela 18- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3

Tabela 19- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,5	8,5	26,4	10,12	8,64	4,04
0,4	8,5	25,5	10,1	8,39	4
18,2	26,9	43,2	10,11	8,58	4,02
2,2	8,9	26,1	10,08	8,5	4,04
2,2	26,5	43,9	10,08	8,59	4
2,2	15,7	33,3	10,05	8,61	4,01
2,2	10,1	29,2	11	8,58	4,01

Tabela 20- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 16°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ inicial (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Delta % CO ₂
1	8	26,4	18,4	6,7	700	50	9,509	5,306	0,531	0,951	0,420
2	8,1	25,5	17,4	6,7	700	50	9,509	4,853	0,485	0,951	0,466
3	8,7	43,2	34,5	6,7	700	50	9,509	12,608	1,261	0,951	-0,310
4	6,7	26,1	19,4	6,7	700	50	9,509	5,760	0,576	0,951	0,375
5	24,3	43,9	19,6	6,7	700	50	9,509	5,851	0,585	0,951	0,366
6	13,5	33,3	19,8	6,7	700	50	9,509	5,941	0,594	0,951	0,357
7	7,9	29,2	21,3	6,7	700	50	9,509	6,622	0,662	0,951	0,289

Nota: Os ensaios 3 e 5 foram excluídos devido à incoerência para com os restantes resultados.

Tabela 21- Resultados do volume de amostra (mL), temperatura inicial e final (°C), diferença de temperaturas e tempo de aplicação (minutos).

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
50	20,7	39,9	19,2	3
50	20,7	39,9	19,2	3
50	20,7	39,9	19,2	3
50	20,4	38,7	18,3	3
50	20,4	38,7	18,3	3

Tabela 22- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,4	10,5	27,1	11,34	8,61	4,02
0,1	10,1	26,8	11,15	8,56	4,05
0,4	10,5	27	11,19	8,6	4,01
0,6	9,7	29,8	10,35	8,62	4,01
0,1	9,1	29,6	10,3	8,58	4,01

Tabela 23- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com um volume de 50 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ inicial (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Delta % CO ₂
1	10,1	27,1	17	6,7	700	50	9,509	4,671	0,467	0,951	0,484
2	10	26,8	16,8	6,7	700	50	9,509	4,581	0,458	0,951	0,493
3	10,1	27	16,9	6,7	700	50	9,509	4,626	0,463	0,951	0,488
4	9,1	29,8	20,7	6,7	700	50	9,509	6,350	0,635	0,951	0,316
5	9	29,6	20,6	6,7	700	50	9,509	6,304	0,630	0,951	0,321

Tabela 24- Compilação dos resultados, relativamente aos ensaios realizados para as temperaturas de 10°C, 13°C, 16°C, 18°C e 20°C, com um volume de amostra de 50 mL.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Média %CO ₂	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	Delta % CO ₂
10,1	22,5	50	6,213	0,621	0,622	9,509	0,951	0,328
		50	6,350	0,635				
		50	5,987	0,599				
		50	5,987	0,599				
		50	6,486	0,649				
		50	6,123	0,612				
		50	6,304	0,630				
		50	6,350	0,635				
13,5	31,5	50	6,486	0,649	0,637	9,509	0,951	0,314
		50	6,259	0,626				
16,3	23,5	50	5,306	0,531	0,619	9,509	0,951	0,332
		50	4,853	0,485				
		50	5,760	0,576				
		50	8,844	0,884				
18,4	40,4	50	6,395	0,639	0,635	9,509	0,951	0,316
		50	6,304	0,630				
20,7	39,9	50	4,671	0,467	0,463	9,509	0,951	0,463
		50	4,581	0,458				
		50	4,626	0,463				
20,4	38,7	50	6,350	0,635	0,633	9,509	0,951	0,318
		50	6,304	0,630				

Nota: Foram excluídos dos resultados, os resultados relativos à temperatura de 20,7°C.

Tabela 25- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO₂ para amostras com um volume de 25 mL.

Ti	Tf	V mL	Média % dCO ₂
10,9	50,3	25	0,22
13,9	50,3	25	0,18
16,2	51	25	0,28
18,1	43,8	25	0,19
20,3	51,8	25	0,24

Tabela 26- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO₂ para amostras com um volume de 50 mL.

Ti	Tf	V mL	Média % dCO ₂
10,1	22,5	50	0,328
13,5	31,5	50	0,314
16,3	23,5	50	0,332
18,4	40,4	50	0,316
20,4	38,7	50	0,318

Tabela 27- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO₂ para amostras com um volume de 75 mL.

Ti	Tf	V mL	Média % dCO ₂
9,8	30,2	75	0,17
13,1	27,4	75	0,21
15,9	28,3	75	0,33
18,5	32,2	75	0,27
20,7	33,2	75	0,32

Tabela 28- Resultados das temperaturas iniciais das amostras, das temperaturas finais, e da percentagem da variação de CO₂ para amostras com um volume de 100 mL.

Ti	Tf	V mL	Média % dCO ₂
10,7	22,7	100	0,19
13,7	24,3	100	0,20
15,9	26,1	100	0,33
18,8	29,5	100	0,19
20,1	30,1	100	0,29

Anexo VII

Ensaio para o estudo da influência do volume de amostra no processo de desgaseificação

Tabela 29-Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
25	10,9	50,3	39,4	3
25	10,9	50,3	39,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
50	10,1	22,5	12,4	3
75	9,8	30,2	20,4	3
75	9,8	30,2	20,4	3
100	10,7	22,7	12	3
100	10,7	22,7	12	3

Tabela 30- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,9	12,5	34,5	10,72	8,61	4
0,8	12,4	34,3	10,65	8,63	4,02
0,2	10,9	30,9	10,38	8,62	4,01
0,4	10,7	30,9	10,38	8,62	4,01
0,5	11,3	34,3	10,56	8,56	4,03
0,3	10,1	34,3	10,25	8,6	4,03
0,5	11,5	34,2	10,45	8,55	4,03
0,6	11,6	34,5	10,49	8,6	4,07

Tabela 31- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 10°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Delta % CO ₂
1	11,6	34,5	22,9	6,7	700	25	9,509	0,951	7,339	0,734	0,217
2	11,6	34,3	22,7	6,7	700	25	9,509	0,951	7,249	0,725	0,226
3	10,7	30,9	20,2	6,7	700	50	9,509	0,951	6,123	0,612	0,339
4	10,3	30,9	20,6	6,7	700	50	9,509	0,951	6,304	0,630	0,321
5	10,8	34,3	23,5	6,7	700	75	9,509	0,951	7,629	0,763	0,188
6	9,8	34,3	24,5	6,7	700	75	9,509	0,951	8,083	0,808	0,143
7	11	34,2	23,2	6,7	700	100	9,509	0,951	7,502	0,750	0,201
8	11	34,5	23,5	6,7	700	100	9,509	0,951	7,638	0,764	0,187

Tabela 32- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
25	13,9	50,3	36,4	3
25	13,9	50,3	36,4	3
50	13,5	31,5	18	3
50	13,5	31,5	18	3
75	13,1	27,4	14,3	3
75	13,1	27,4	14,3	3
100	13,7	24,3	10,6	3
100	13,7	24,3	10,6	3

Tabela 33- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de degaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
1	12	34,9	10,43	8,59	4,03
0,5	11,1	34,3	10,35	8,66	4,05
0,5	8,6	29,1	10,37	8,51	4,04
0,3	8,7	28,9	10,35	8,5	4,02
0,4	10,9	33,5	10,36	8,57	4,01
0,2	10,6	33,4	10,35	8,65	4,05
0,6	10,2	33,1	10,27	8,62	4,07
0,4	9,9	32,6	10,32	8,63	4,01

Tabela 34- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 13°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Delta % CO ₂
1	11	34,9	23,9	6,7	700	25	9,509	0,951	7,792	0,779	0,172
2	10,6	34,3	23,7	6,7	700	25	9,509	0,951	7,702	0,770	0,181
3	8,1	29,1	21	6,7	700	50	9,509	0,951	6,486	0,649	-5,837
4	8,4	28,9	20,5	6,7	700	50	9,509	0,951	6,259	0,626	-5,633
5	10,5	33,5	23	6,7	700	75	9,509	0,951	7,402	0,740	0,211
6	10,4	33,4	23	6,7	700	75	9,509	0,951	7,402	0,740	0,211
7	9,6	33,1	23,5	6,7	700	100	9,509	0,951	7,638	0,764	0,187
8	9,5	32,6	23,1	6,7	700	100	9,509	0,951	7,457	0,746	0,205

Tabela 35- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
25	16,2	51	34,8	3
25	16,2	51	34,8	3
50	16,3	32,4	16,1	3
50	16,3	32,4	16,1	3
75	15,9	28,3	12,4	3
75	15,9	28,3	12,4	3
100	15,9	26,1	10,2	3
100	15,9	26,1	10,2	3

Tabela 36- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,4	10,4	31,5	10,31	8,6	4
0,8	10,6	31,2	10,28	8,64	4,06
0,5	8,5	26,4	10,12	8,64	4,04
2,2	8,9	26,1	10,08	8,5	4,04
0,3	9,9	30	10,37	8,6	4,05
0,4	9,9	30	10,3	8,6	4,04
0,3	9,5	30,1	10,34	8,59	4,01
0,4	9,9	29,9	10,4	8,61	4,06

Tabela 37- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 16°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Delta %CO ₂
1	10	31,5	21,5	6,7	700	25	9,509	0,951	6,705	0,670	0,280
2	9,8	31,2	21,4	6,7	700	25	9,509	0,951	6,660	0,666	0,285
3	8	26,4	18,4	6,7	700	50	9,509	0,951	5,306	0,531	0,420
4	6,7	26,1	19,4	6,7	700	50	9,509	0,951	5,760	0,576	0,375
5	9,6	30	20,4	6,7	700	75	9,509	0,951	6,221	0,622	0,329
6	9,5	30	20,5	6,7	700	75	9,509	0,951	6,266	0,627	0,324
7	9,2	30,1	20,9	6,7	700	100	9,509	0,951	6,456	0,646	0,305
8	9,5	29,9	20,4	6,7	700	100	9,509	0,951	6,229	0,623	0,328

Tabela 38- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
25	18,1	43,8	25,7	3
25	18,1	43,8	25,7	3
50	18,4	40,4	22	3
50	18,4	40,4	22	3
75	18,5	32,2	13,7	3
75	18,5	32,2	13,7	3
100	18,8	29,5	10,7	3
100	18,5	29,3	10,8	3

Tabela 39- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
7,8	17,1	33,5	10,36	8,64	4
1	10,2	31,9	10,35	8,6	4,05
0,8	10,1	30,1	10,34	8,56	4,01
0,1	9,3	29,8	10,35	8,56	4,02
0,6	10,15	31,3	10,45	8,65	4,03
0,5	10,3	31,3	10,45	8,63	4,02
0,5	11,5	34,5	10,5	8,6	4,07
0,2	11,2	34,4	10,48	8,65	4,03

Tabela 40- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 18°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Delta % CO ₂
1	9,3	33,5	24,2	6,7	700	25	9,509	0,951	7,928	0,793	0,158
2	9,2	31,9	22,7	6,7	700	25	9,509	0,951	7,249	0,725	0,226
3	9,3	30,1	20,8	6,7	700	50	9,509	0,951	6,395	0,639	0,311
4	9,2	29,8	20,6	6,7	700	50	9,509	0,951	6,304	0,630	0,321
5	9,55	31,3	21,75	6,7	700	75	9,509	0,951	6,834	0,683	0,268
6	9,8	31,3	21,5	6,7	700	75	9,509	0,951	6,720	0,672	0,279
7	11	34,5	23,5	6,7	700	100	9,509	0,951	7,638	0,764	0,187
8	11	34,4	23,4	6,7	700	100	9,509	0,951	7,593	0,759	0,192

Tabela 41- Resultados relativos às temperaturas iniciais, às temperaturas finais, as diferenças de temperatura e aos tempos de aplicação, para amostras com volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Volume (mL)	Ti (°C)	Tf (°C)	DeltaT	ta (min)
25	20,3	51,8	31,5	3
25	20,3	51,8	31,5	3
50	20,4	38,7	18,3	3
50	20,4	38,7	18,3	3
75	20,7	33,2	12,5	3
75	20,7	33,2	12,5	3
100	20,1	30,1	10	3
100	20,1	30,1	10	3

Tabela 42- Resultados referentes aos volumes lidos na bureta (mL), para a determinação da percentagem de desgaseificação, para volumes compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL. Valores de pH inicial, pH1 (1ª fase da titulação), pH2 (2ª fase da titulação).

Vi,b	V1	V2	pH,i	pH,1	pH,2
0,3	10,2	32,5	10,38	8,63	4,02
0,1	9,5	31,8	10,36	8,63	3,99
0,4	10,5	27,1	11,34	8,61	4,02
0,1	10,1	26,8	11,15	8,56	4,05
0,2	9,2	29,6	10,35	8,61	4,06
0,2	9,6	30	10,31	8,61	4,06
0,2	9,1	30,1	10,4	8,61	3,98
0,4	9,5	30,2	10,41	8,59	4,01

Tabela 43- Resultados obtidos para ensaios realizados à temperatura de 20°C, para a determinação da percentagem da variação do CO₂ nas amostras, com volumes de amostras compreendidos entre os 25 mL e os 100 mL.

Ensaio	V1	V2	n	n'	Vgarrafa	Vamostra	CO ₂ i (g/L)	% CO ₂ i	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	Delta % CO ₂
1	9,9	32,5	22,6	6,7	700	25	9,509	0,951	7,203	0,720	0,231
2	9,4	31,8	22,4	6,7	700	25	9,509	0,951	7,113	0,711	0,240
3	10,1	27,1	17	6,7	700	50	9,509	0,951	4,671	0,467	0,484
4	10	26,8	16,8	6,7	700	50	9,509	0,951	4,581	0,458	0,493
5	9	29,6	20,6	6,7	700	75	9,509	0,951	6,312	0,631	0,320
6	9,4	30	20,6	6,7	700	75	9,509	0,951	6,312	0,631	0,320
7	8,9	30,1	21,2	6,7	700	100	9,509	0,951	6,593	0,659	0,292
8	9,1	30,2	21,1	6,7	700	100	9,509	0,951	6,547	0,655	0,296

Tabela 44- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 10°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ i (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Média %CO ₂	Delta %CO ₂	Média % dCO ₂
10,9	50,3	25	9,509	7,339	0,734	0,951	0,729	0,217	0,222
			9,509	7,249	0,725	0,951		0,226	
10,1	22,5	50	9,509	6,123	0,612	0,951	0,621	0,339	0,330
			9,509	6,304	0,630	0,951		0,321	
9,8	30,2	75	9,509	7,629	0,763	0,951	0,786	0,188	0,165
			9,509	8,083	0,808	0,951		0,143	
10,7	22,7	100	9,509	7,502	0,750	0,951	0,757	0,201	0,194
			9,509	7,638	0,764	0,951		0,187	

Tabela 45- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 13°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ i (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Média % CO ₂	Delta % CO ₂	Média %dCO ₂
13,9	50,3	25	9,509	7,792	0,779	0,951	0,775	0,172	0,176
			9,509	7,702	0,770	0,951		0,181	
13,5	31,5	50	9,509	0,649	0,649	0,951	0,637	0,302	0,314
			9,509	0,626	0,626	0,951		0,325	
13,1	27,4	75	9,509	7,402	0,740	0,951	0,740	0,211	0,211
			9,509	7,402	0,740	0,951		0,211	
13,7	24,3	100	9,509	7,638	0,764	0,951	0,755	0,187	0,196
			9,509	7,457	0,746	0,951		0,205	

Tabela 46- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 16°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ i (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Média % CO ₂	Delta % CO ₂	Média %dCO ₂
16,2	51	25	9,509	6,705	0,670	0,951	0,668	0,280	0,283
			9,509	6,660	0,666	0,951		0,285	
16,3	32,4	50	9,509	5,306	0,531	0,951	0,553	0,420	0,398
			9,509	5,760	0,576	0,951		0,375	
15,9	28,3	75	9,509	6,221	0,622	0,951	0,624	0,329	0,327
			9,509	6,266	0,627	0,951		0,324	
15,9	26,1	100	9,509	6,456	0,646	0,951	0,634	0,305	0,317
			9,509	6,229	0,623	0,951		0,328	

Tabela 47- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 18°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ i (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Média % CO ₂	Delta % CO ₂	Média % dCO ₂
18,1	43,8	25	9,509	7,928	0,793	0,951	0,759	0,158	0,192
			9,509	7,249	0,725	0,951		0,226	
18,4	40,4	50	9,509	6,395	0,639	0,951	0,635	0,311	0,316
			9,509	6,304	0,630	0,951		0,321	
18,5	32,2	75	9,509	6,834	0,683	0,951	0,678	0,268	0,273
			9,509	6,720	0,672	0,951		0,279	
18,8	29,5	100	9,509	7,638	0,764	0,951	0,762	0,187	0,189
			9,509	7,593	0,759	0,951		0,192	

Tabela 48- Compilação de resultados para a temperatura inicial da amostra de 20°C, em função dos diferentes volumes de amostra em estudo, para a determinação da percentagem de variação do CO₂.

Ti (°C)	Tf (°C)	V (mL)	CO ₂ i (g/L)	CO ₂ (g/L)	% CO ₂	% CO ₂ i	Média % CO ₂	Delta % CO ₂	Média %dCO ₂
20,3	51,8	25	9,509	7,203	0,720	0,951	0,716	0,231	0,235
			9,509	7,113	0,711	0,951		0,240	
20,4	38,7	50	9,509	4,671	0,467	0,951	0,463	0,484	0,488
			9,509	4,581	0,458	0,951		0,493	
20,7	33,2	75	9,509	6,312	0,631	0,951	0,631	0,320	0,320
			9,509	6,312	0,631	0,951		0,320	
20,1	30,1	100	9,509	6,593	0,659	0,951	0,657	0,292	0,294
			9,509	6,547	0,655	0,951		0,296	