

 M 2018

U. PORTO
FEUP FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

O HIDROXIMETILFURFURAL NOS VINHOS E O EFEITO DA TÉCNICA DE PRODUÇÃO NA SUA CONCENTRAÇÃO

ANA SOFIA RIBEIRO MOREIRA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

O Hidroximetilfurfural nos vinhos e o efeito da técnica de produção na sua concentração

Dissertação de Mestrado

de

Ana Sofia Ribeiro Moreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Aveleda SA.



Orientador na FEUP: Prof. Lúcia Santos

Orientador na Aveleda: Eng. Susete Rodrigues



Departamento de Engenharia Química

outubro de 2018

*“Never walk down the path,
because it leads only to where the
others have gone”*

Alexander Graham Bell

Agradecimentos

Ao longo desta caminhada, que foi a realização deste projeto, foram várias as pessoas envolvidas direta ou indiretamente e às quais pretendo deixar o meu sincero obrigado.

Primeiramente gostaria de agradecer, à Eng^a Susete Rodrigues da Aveleda, por toda a ajuda, toda a disponibilidade dispensada ao longo dos 6 meses e por todas as opiniões que, de alguma forma, enriqueceram o projeto.

À prof^a Lúcia Santos, agradeço de uma forma especial, por todo o apoio e orientação ao longo do projeto e, por toda a paciência, essencialmente nesta última fase.

À prof^a Joana Peres, por toda a ajuda, disponibilidade e paciência sempre que a solicitei.

Não poderia deixar de agradecer à Aveleda S.A, em especial ao Eng^o Manuel Soares, por me terem proporcionado a realização deste projeto, e a todos os funcionários da mesma por me terem recebido sempre de uma forma tão agradável e acolhedora.

Aos colegas de trabalho, Vanessa, Catarina e Pedro, pelo companheirismo, motivação e boa disposição diária, sem vocês o projeto não teria sido o mesmo.

Ao IVDP, pela forma como me receberam e em especial, à Dr^a Ana, pela grande ajuda.

Aos meus amigos de longa data, obrigada por terem estado sempre a meu lado e por tudo o que já me proporcionaram.

Aos amigos da faculdade, serão certamente para a vida, obrigada pelos 5 anos fantásticos sem vocês não teria sido a mesma coisa.

Agradeço à minha família que sem dúvida são os alicerces da minha vida, com um agradecimento muito especial à Sandra Ribeiro, pela grande ajuda e disponibilidade.

Quase no fim, no entanto, com a grande importância que lhes é devida, aos meus pais o meu mais sincero agradecimento por me terem dado a oportunidade de estar aqui hoje a realizar o projeto, por todas as palavras de motivação ao longo de toda a minha vida.

Ao meu namorado João, um grande obrigado por toda a compreensão nas tantas horas de trabalho, por todo o apoio incondicional e incentivo ao longo destes anos.

Por fim, à minha Ninó, o apoio de todas as horas, obrigada por achares que faço sempre mais e melhor.

E, a todos sem exceção, o meu muito obrigada!

A Prof^a. Lúcia Santos, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado pelo POCI-01-0145-FEDER-006939, Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Resumo

A qualidade é hoje parte integrante da política de todas as empresas da área alimentar, nomeadamente do setor vinícola, sendo que para a sua manutenção é necessário controlo e investigação constante, permitindo assim à empresa ser pioneira e tornar-se mais competitiva no mercado.

Deste modo, a presente dissertação, foca-se na análise da evolução do hidroximetilfurfural (HMF) em vinhos com diferentes técnicas de vinificação utilizadas na Aveleda S.A. Tendo em conta a escassez de estudos sobre este composto em vinhos foram testados diversos fatores, como o processo de dessulfitação, as condições e o tempo de armazenamento e, a concentração de açúcares, que pudessem alterar a evolução do mesmo.

O estudo foi acompanhado nas diferentes etapas por análise química, constatando que o HMF está presente em todos os vinhos estudados, no entanto atinge as concentrações mais elevadas (acima de 10 g/L), quando o vinho possui gramagens de açúcar superiores a 20 g/L e sujeitos a condições de armazenamento extremas (temperaturas >20 °C).

A nível da inovação, tanto as provas organolépticas para perceber o limiar de perceção do consumidor, sendo que este apenas deteta a presença do composto quando este assume valores próximos dos 15 mg/L, como no sentido da remoção do mesmo, em que ao final de 8 dias de contacto do vinho com carvão ativado é conseguida uma remoção total de 55 %.

Por último, no sentido de avaliar a posição da Aveleda SA em relação aos seus concorrentes diretos de vinho branco e rosé, a nível da concentração do HMF, foi possível verificar a sua excelente posição tendo os vinhos com menor teor de HMF do estudo.

Palavras Chave: Hidroximetilfurfural, vinhos, qualidade, açúcares, dessulfitação, edulcoração, provas sensoriais, limiar de perceção

Abstract

Nowadays, quality is an integral part of the policy of all companies in the food sector, particularly in the wine sector. To ensure quality, it is necessary a constant control and research, which allows the company to be a pioneer and become more competitive in the market.

Therefore, the present dissertation focuses on the analysis of hydroxymethylfurfural in wines with different vinification techniques used in Aveleda S.A. Due to the lack of studies of mentioned molecule in wines, several factors were tested, such as the desulphurisation process, conditions, storage time and the concentration of sugars that could alter the evolution of the same.

The study was followed in the different stages by chemical analysis, detecting HMF presence in all wine samples, acknowledging it reaches the highest HMF concentrations (above 10 g/L) when the wine sugar content is higher than 10 g/L and subject to extreme storage conditions (elevated temperatures).

At the level of innovation, both the organoleptic tests, that perceive the threshold of consumer perception, which only detects the presence of the compound when the compound assumes values close to 15 mg/L, and towards its removal, in which at the end of 8 days of contact of the wine with activated carbon a total removal of 55% is achieved.

Finally, it was evaluated the position of Aveleda SA in comparison to the direct competitors of white and rosé wines, in terms of HMF concentration. It was possible to verify the excellent position of Aveleda SA wines which obtained the lowest HMF content of the study.

Keywords: Hydroxymethylfurfural, wines, quality, sugars, desulphurisation, sweetening, sensory evidence/tests, threshold of perception

Declaração

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

Porto, 1 de outubro de 2018

Ana Sofia Ribeiro Moreira

(Ana Sofia Ribeiro Moreira)

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa	1
1.3	Contributos do Trabalho.....	4
1.4	Organização da Tese	5
2	Contexto e Estado da Arte	6
2.1	“Vinho”	6
2.1.1	Processos de produção	6
2.2	Meio de preservação do mosto	7
2.2.1	Dióxido de Enxofre.....	7
2.3	Hidroximetilfurfural	10
3	Materiais e Métodos	13
3.1	Método Experimental de análise HMF.....	13
3.1.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	13
3.2	Análise Estatística.....	15
3.2.1	<i>Design Of Experiments</i> (DOE).....	15
3.3	Provas Sensoriais.....	16
3.3.1	Provas Triangulares	17
3.3.2	Provas Preferenciais	18
4	Resultados e Discussão	19
4.1	Concentração de açúcares vs condições de armazenamento	19
4.1.1	Análise estatística	21
4.2	Técnicas de edulcoração	23
4.3	Processo de dessulfitação	25
4.3.1	Percentagem de dessulfitação.....	25
4.3.2	Temperatura de dessulfitação	26
4.3.3	Análise estatística	27

4.4	Técnicas de produção	29
4.4.1	Casal Garcia	29
4.4.2	Aveleda	31
4.5	Provas sensoriais	33
4.5.1	Provas triangulares	34
4.5.2	Provas preferenciais	38
4.6	Vinhos Concorrentes de Mercado	40
4.7	Remoção HMF	41
5	Conclusões	43
6	Avaliação do trabalho realizado	45
6.1	Objetivos Realizados	45
6.2	Outros Trabalhos Realizados.....	45
6.3	Limitações e Trabalho Futuro	45
6.4	Apreciação Final	46
Anexo A	Dessulfitorador	51
Anexo B	Determinação dos Teores de Anidrido Sulfuroso Livre e Total	52
B.1	Determinação pelo Método de Ripper	52
B.1.1	Determinação do anidrido sulfuroso livre	52
B.1.2	Determinação do anidrido sulfuroso total	52
B.1.3	Substâncias Interferentes.....	52
B.1.4	Resultados	52
B.2	Determinação com Titulador Automático	53
B.2.1	Determinação do anidrido sulfuroso livre	53
B.2.2	Determinação do anidrido sulfuroso total	53
Anexo C	Exemplos de Cálculo	55
C.1	Concentração de açúcares	55
C.2	Desvios Padrão	55
C.3	Volume a adicionar de HMF	55
C.4	Resultados provas triangulares	57

Anexo D	Tabelas de Resultados.....	59
D.1	Concentração de açúcares vs condições de armazenamento	59
D.2	Técnicas de edulcoração	61
D.3	Percentagem de dessulfitação.....	62
D.4	Temperatura de dessulfitação.....	62
D.5	Técnicas de produção.....	63
Anexo E	Fichas de Prova.....	65
E.1	Prova triangular	65
E.2	Prova preferencial.....	66
Anexo F	Tabelas de probabilidades ISO 4120:2004	67
Anexo G	Implementação do método espectrofotométrico.....	70

Lista de Figuras

Figura 1- Vista aérea da Quinta da Aveleda, Penafiel.....	1
Figura 2- Atuais marcas de comercialização Aveleda, segunda a sua região Demarcada de Origem	3
Figura 3 - Certificações atribuídas pela APCER à Quinta da Aveleda, adaptado (APCER 2018)	4
Figura 4- Processo de viticultura na Aveleda SA.....	6
Figura 5- Fluxograma representativo da produção de vinho, incluindo o processo de vinificação, conservação/elaboração de lotes, engarrafamento e armazenamento.....	7
Figura 6- Representação da quantidade total de enxofre (S), em cada uma das suas formas, em função dos diferentes valores de pH, adaptado (Kenneth C. Fugelsang 2007).	8
Figura 7- Esquematização simplificada do processo de dessulfitação	9
Figura 8- Representação molecular do HMF	10
Figura 9- Rota de formação do HMF, tendo a frutose e glicose como substratos primários, adaptado (Capuano and Fogliano 2011, Kowalski, Lukasiewicz et al. 2013).	11
Figura 10- HPLC 1200 Agilent, com detetor DAD	13
Figura 11- Programa de gradiente utilizado na análise por HPLC, do HMF.	14
Figura 12- Fotografia da sala de provas, Quinta da Aveleda, já com as respetivas garrafas e copos prontos para a prova.	16
Figura 13- Fotografia da disposição dos copos em prova.	17
Figura 14- Fotografia do modelo de copo aconselhado pela ISO	17
Figura 15- Representação dos copos para o teste triangular, com os respetivos códigos randomizados.	17
Figura 16- Exemplo de um esquema da atribuição da pontuação na prova preferencial.	18
Figura 17 - Concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, a 20 °C, com diferentes concentrações de açúcares (gL^{-1}), ao longo do tempo.....	20
Figura 18 - Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 40 °C, com diferentes concentrações de açúcares (gL^{-1}), ao longo do tempo.....	20
Figura 19- Gráfico da distribuição normal de resíduos, para o estudo da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e tempo.	21
Figura 20- Gráfico da distribuição normal de resíduos, para o estudo da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e tempo	22
Figura 21- Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 20°C, edulcorados com MCR, ao longo do tempo.	24

Figura 22- Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 20°C , edulcorados com Muté, ao longo do tempo.	24
Figura 23 - Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos SPL, com diferentes % D, ao longo do tempo.	25
Figura 24- Concentração de HMF (mgL^{-1}) para vinhos SPL 100% DE, a 100 e 120°C , e ao longo do tempo.	26
Figura 25- Gráficos da distribuição normal de resíduos, tanto para a % D (A), como para a temperatura de D (B).	27
Figura 26- Gráficos da distribuição normal de resíduos, após a seleção dos fatores significativos, tanto para a % D (A), como para a temperatura de D (B).	28
Figura 27- Concentração de HMF (mgL^{-1}) em CG Sweet 40 e 60 g/L, a 20 e 40°C , ao longo do tempo.	30
Figura 28- Concentração de HMF (mgL^{-1}) em CG Base, a 20 e 40°C , ao longo do tempo.	30
Figura 29- Concentração de HMF (mgL^{-1}) no vinho QA, a 20 e 40°C , ao longo do tempo.	31
Figura 30- Concentração de HMF (mgL^{-1}) no vinho Aveleda Loureiro 4 e 8 g/L açúcar, a 20 e 40°C , ao longo do tempo.	32
Figura 31- Concentração de HMF (mgL^{-1}) no vinho Aveleda Alvarinho a 20°C , ao longo do tempo.	33
Figura 32- Concentração de HMF (mgL^{-1}), em vinhos do mercado Aveleda e concorrente.	40
Figura 33- Concentração de HMF (mgL^{-1}), no vinho CG Base com adição da quantidade máxima permitida de carvão ativado, ao longo dos dias.	42
Figura A1- Esquemática do Dessulfitor Strassburguer.	51
Figura F1- Número de provadores necessários para o teste triangular.	67
Figura F2- Número máximo de respostas corretas, necessários para que duas amostras sejam similares.	68
Figura F3- Valores da distribuição normal.	69
Figura G 1- Espectrofotómetro da Aveleda, Jasco V530.	70
Figura G2- Curva de calibração para o método de espectrofotometria de análise do HMF.	71

Lista de Tabelas

Tabela 1- Condições de operação do 1200 Agilent para a determinação do HMF.	14
Tabela 2- Análise ANOVA para o modelo experimental, concentração de açúcares vs condições de armazenamento.....	23
Tabela 3- Análise ANOVA para o modelo experimental, % D.	28
Tabela 4- Análise ANOVA para o modelo experimental, temperatura D.	29
Tabela 5- Apresentação dos resultados das provas triangulares para os 23 provadores.....	34
Tabela 6- Resultados da 1ª prova triangular, para os vinhos CG Rosé e Branco.	35
Tabela 7- Resultados da 1ª prova triangular, para os vinhos QA.	36
Tabela 8- Resultados da 2ª prova triangular, para o vinho QA 40 mg/L.....	37
Tabela 9- Resultados da 2ª prova triangular, para o vinho QA 60 mg/L.....	37
Tabela 10- Resultados da 1ª prova preferencial, para o vinho QA	38
Tabela 11- Resultados da 1ª prova preferencial, para o vinho CG Base.....	39
Tabela 12- - Resultados da 2ª prova preferencial, para o vinho QA 20 g/L.....	39
Tabela 13- Percentagens das quantidades de HMF removidas com a aplicação dos produtos enológicos, para a quantidade máxima permitida por lei e metade da mesma.....	41
Tabela D1- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, com diferentes concentrações de açúcares (gL^{-1}), a diferentes temperaturas de armazenamento, °C, ao longo do tempo.	60
Tabela D2- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, sujeitos a diferentes técnicas de edulcoração, MCR e Muté, ao longo do tempo.	61
Tabela D3- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), em vinho SPL, sujeitos a diferentes % de dessulfitação, 20; 40 e 60, ao longo do tempo.....	62
Tabela D4- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), em vinho SPL, sujeitos a diferentes Temperaturas de dessulfitação, 100 e 120 °C, ao longo do tempo.....	62
Tabela D5- Resultados da concentração de HMF(mgL^{-1}), para Casal Garcia produto acabado, sujeitos a diferentes temperaturas de armazenamento 20 e 40 °C, ao longo do tempo.	63
Tabela D6- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para Casal Garcia produto acabado, sujeitos a diferentes temperaturas de armazenamento 20 e 40 °C, ao longo do tempo.	64

Notação e Glossário

M	Molar	gL^{-1}
[C]	Concentração mássica	gL^{-1}
S_{BET}	Área superficial específica	m^2g^{-1}

Letras gregas

λ	Comprimento de onda	nm
σ	desvio padrão	°

Índices

°	Grau
---	------

Lista de Siglas

CG	Casal Garcia
DAD	<i>Detector Diode Array</i> (Detetor Diodos)
D	Dessulfitação
DE	Dessulfitado
DOE	<i>Design of Experiments</i>
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IFD	<i>Institute of Food Technologists</i>
IVDP	Instituto de Vinhos Douro e Porto
MCR	Mosto Concentrado Retificado
ppm	Partes por milhão
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QA	Quinta da Aveleda
RDB	Região Demarcada da Bairrada
RDD	Região Demarcada do Douro
RDVV	Região Demarcada dos Vinhos Verdes
SMF	5-Sulfooximetilfurfural
SO ₂	Dióxido de Enxofre/Sulfuroso/Anidrido Sulfuroso
SPL	Seco para lotes
vs	<i>Versus</i>

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A produção mundial de vinhos tem aumentado nos últimos anos e, paralelamente a este crescimento, tem existido também um aumento de novos produtores, tornando este mercado cada vez mais competitivo. A preocupação de investir nas tecnologias que aperfeiçoam os processos é cada vez maior, elevando dia após dia os padrões de qualidade.

Os principais objetivos do estudo assentam na evolução da concentração do HMF nos vinhos brancos e rosés e no impacto da sua qualidade organolética. As diferentes técnicas de produção, o impacto da dessulfitação na formação da molécula e ainda a influência da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e técnicas de edulcoração são também parte destes objetivos.

As propriedades sensoriais dos vinhos continuam a ser prioridade dos produtores, sendo que todos os compostos são analisados cada vez com mais detalhe, tentando sempre eliminar todos aqueles que potenciam um sabor secundário e indesejado ao vinho. Com o intuito de ser pioneira, a empresa resolveu realizar um estudo de um composto, hidroximetilfurfural, ainda pouco analisado em vinhos verdes, percebendo qual a sua evolução e perceção nos diferentes vinhos produzidos e de que forma esta poderia ser diminuído e/ou eliminado.

1.2 Apresentação da Empresa

A Quinta da Aveleda, uma empresa familiar de várias gerações, localizada em Penafiel (figura 1) é atualmente a maior exportadora de Vinho Verde, sendo também produtora de queijos e aguardentes. Sabe-se que a sua história se estende no tempo e que se tratou sempre de uma propriedade agrícola, no entanto, é só a partir do século XVI que começam a surgir os primeiros registos. (Aveleda.a) 2018).



Figura 1-Vista aérea da Quinta da Aveleda, Penafiel

Manoel Pedro Guedes de Silva da Fonseca foi o grande impulsionador, uma vez que em meados do século XIX, decide deixar a vida atarefada da cidade e dedicar-se à Quinta da Aveleda, apostando no desenvolvimento tanto da parte agrícola como das estruturas.

No entanto, a sua grande expansão dá-se por volta do ano de 1946, quando uma das gerações cria a primeira sociedade agrícola para a administração da quinta, tendo conseguido um rápido crescimento de exportações de Vinho Verde, essencialmente para o Brasil e África. Esta fase de prosperidade implicou também grandes investimentos tecnológicos, mas foi no final do séc. XX que houve uma nova aposta na melhoria da qualidade, produção e embalamento do vinho, paralelamente a um aumento apreciável da capacidade de armazenagem.

Relativamente à produção, os 205 hectares de vinhas que a Quinta da Aveleda possui, permitiram à empresa produzir cerca de 18 milhões de garrafas em 2017, sendo esperado que, em 2020, alcancem os 20 milhões de garrafas. A área da Aveleda na Região demarcada dos Vinhos Verdes (RDVV) é dividida por Penafiel (63%), Lousada (13%) e Celorico de Basto (24%), sendo ocupada, essencialmente, por castas de uvas brancas Alvarinho, Arinto, Fernão Pires, Loureiro e Trajadura. A par com os vinhos RDVV, a Aveleda tem incluído no seu portfólio vinhos da Região Demarcada do Douro (RDD) e vinhos da Região Demarcada da Bairrada (RDB). No esquema abaixo (figura 2) tornam-se evidentes estas regiões e quais os vinhos comercializados segundo a sua demarcada de origem (Aveleda.b) 2018).

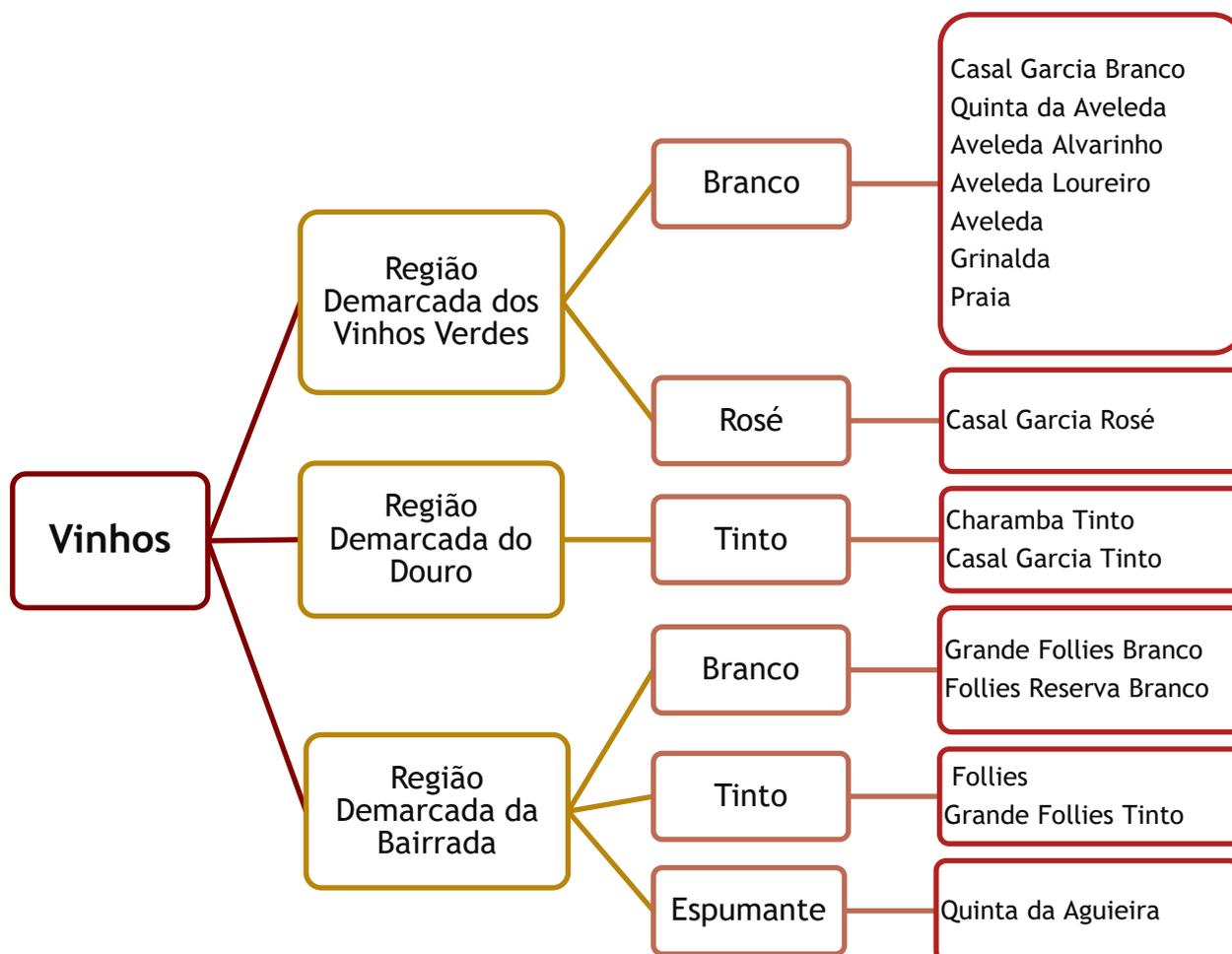


Figura 2-Atuais marcas de comercialização Aveleda, segunda a sua região Demarcada de Origem

A empresa exporta, atualmente, para cerca de 100 países do mundo, sendo que esta representa cerca de 70% da faturação total. Em 2017, o vinho Casal Garcia, paralelamente ao prémio que já alcança há alguns anos em ser o vinho verde com maior exportação, foi também o mais vendido em Portugal, ultrapassando todos os vinhos portugueses de topo.

Nos dias de hoje, uma das maiores preocupações da empresa consiste na obtenção de certificados de qualidade, uma vez que é um modo de competitividade entre as principais empresas multi/nacionais. Em 2001, começam por obter a certificação da ISO 9001. No entanto, ao longo dos anos várias melhorias contínuas têm sido implementadas para que outras certificações possam ser obtidas. Em 2008, obteve a certificação com o referencial ISO 14001. Em 2010, certificaram o seu sistema de segurança alimentar com o referencial EN NP ISO 22000:2005 e, em 2014, através das competências adquiridas nas áreas das energias renováveis, obtiveram a certificação de acordo com o referencial ISO 50001.

Toda a responsabilidade social da Aveleda e a incorporação das melhores práticas, de forma a identificar ações e recomendações de melhoria contínua, é de mais fácil percepção através da figura abaixo.



Figura 3 - Certificações atribuídas pela APCER à Quinta da Aveleda, adaptado (APCER 2018)

É possível evidenciar que a empresa se debruça num processo contínuo de melhorar a sua organização, gestão e preservação de todos estes selos de qualidade para continuar como concorrente de topo, tanto a nível nacional, como internacional.

1.3 Contributos do Trabalho

O projeto teve como foco principal o estudo do efeito do HMF nos vinhos, nomeadamente a sua formação de acordo com as diferentes técnicas de produção e a sua respetiva evolução, de forma a aumentar os padrões de qualidade sensorial.

Acerca do HMF são poucos os estudos existentes, principalmente em vinhos verdes uma vez que existem outros compostos prioritários que têm despertado mais interesse.

Foi então importante avaliar as concentrações que se formavam nos vinhos produzidos, para iniciar o estudo com os vários fatores que possivelmente afetariam a evolução da formação do referido composto. Tendo em conta que o limiar de percepção da molécula é desconhecido, o seu estudo permitiu que a Aveleda SA. se pudesse tornar pioneira nesse setor.

1.4 Organização da Tese

Esta dissertação encontra-se estruturada em seis capítulos fundamentais:

- Capítulo 1: **Introdução**, é feito todo o enquadramento e apresentação do projeto, definindo objetivos principais.
- Capítulo 2: **Contexto e Estado de arte**, fazendo uma breve introdução aos processos de produção e preservação de vinho, mostrando também a rota de formação do HMF.
- Capítulo 3: **Materiais e Métodos**, destacando a metodologia de análise do HMF, a aplicação de um programa estatístico necessário à avaliação dos resultados obtidos e, introdução às provas sensoriais testadas.
- Capítulo 4: **Resultados e Discussão**, são expostos, discutidos e analisados estatisticamente todos os resultados obtidos neste estudo.
- Capítulo 5: **Conclusões**, expondo de forma sucinta as conclusões retiradas do capítulo anterior.
- Capítulo 6: **Avaliação do Trabalho Realizado**, apresentando uma retrospectiva de todo o trabalho desenvolvido e uma apreciação crítica do mesmo. Por fim, ainda se apresentam propostas de trabalhos futuros

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 “Vinho”

Desde o início da civilização, mesmo antes de datar a época dos Romanos, o vinho já era apreciado, visto mesmo como um privilégio das classes altas. Foi evoluindo, começando a fazer parte da cultura, do dia a dia e das dietas europeias, acompanhando a expansão do Império Romano pelo Mediterrâneo. Acredita-se que a sua origem, nos tempos primórdios, é do sul do Cáucaso (McGovern, Jalabadze et al. 2017), onde atualmente se situa o Azerbaijão, Geórgia, Iraque, entre outros.

Segundo o regulamento CE nº479/2008 (Europeia 2008), que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, designa-se por “vinho”, o produto que é obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas. Já quando se fala em “mosto de uvas”, segundo o regulamento acima mencionado, entende-se como o produto líquido obtido naturalmente, ou então por processos físicos a partir de uvas frescas.

2.1.1 Processos de produção

O processo de produção de vinho engloba um conjunto de atividades que se dividem essencialmente em dois grupos, a viticultura e a vinificação.

Todo o processo da produção de uvas corresponde ao processo de viticultura, sendo que é essencial que este seja executado com sucesso, uma vez que tem um impacto direto e forte na qualidade do vinho posteriormente produzido. Relativamente ao processo de produção de vinho, este inclui não só a vinificação, mas também a elaboração dos lotes, engarrafamentos e armazenamentos de acordo com as marcas comerciais existentes (Ferreira 2010).

Através da figura a abaixo, evidencia-se de uma forma mais sintética todos os parâmetros correspondentes à viticultura, na Aveleda.



Figura 4- Processo de viticultura na Aveleda SA.

Quanto ao processo de produção de vinho, esse grupo já se torna um pouco mais complexo visto incluir uma série de parâmetros, representados de forma sistemática no fluxograma abaixo.

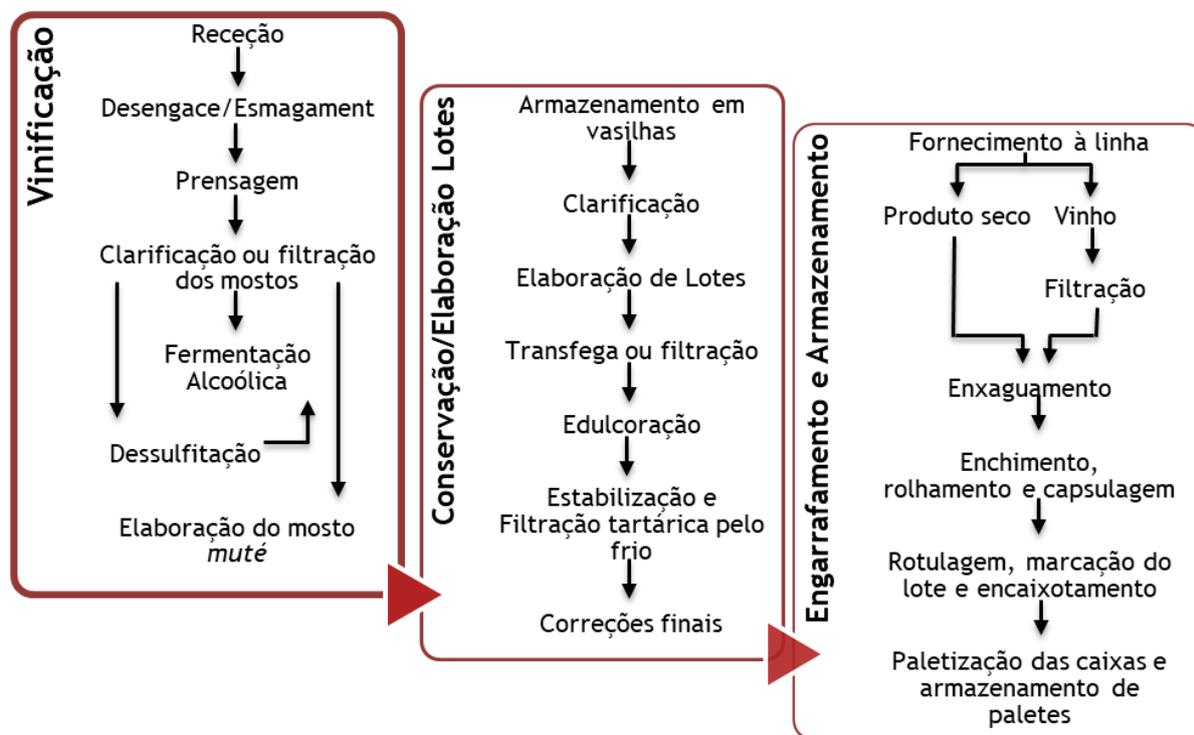


Figura 5- Fluxograma representativo da produção de vinho, incluindo o processo de vinificação, conservação/elaboração de lotes, engarrafamento e armazenamento.

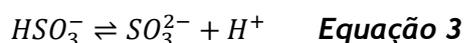
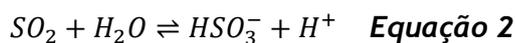
2.2 Meio de preservação do mosto

Devido à elevada quantidade de mosto conseguido nas épocas altas de vinificação, os produtores, de forma a produzirem vinho fresco durante o ano inteiro, preservam porções de mosto, inibindo a sua fermentação com agentes externos.

Atualmente, é utilizado o dióxido de enxofre (SO_2) como o principal meio de preservação. No entanto, existem outros meios conhecidos que também o permitem.

2.2.1 Dióxido de Enxofre

O SO_2 é utilizado essencialmente pelas suas capacidades antioxidantes, antioxidásicas e antisséticas, pois permitem uma estabilização oxidativa e microbiológica do mosto durante o processo de armazenamento (A.S. Curvelo-Garcia 2015). Este composto, quando misturado com água apresenta um equilíbrio entre três formas (Erik R. Christensen), como é possível observar pelas equações abaixo:



Na equação 1, é possível observar-se a forma molecular $SO_2 \cdot H_2O$, sendo que na equação 2 e 3, se verifica o ião bissulfito HSO_3^- e o ião sulfito SO_3^{2-} , respetivamente.

Todo o equilíbrio representado acima, é fortemente dependente do pH. Durante o processo de preservação do mosto, como se pode observar pela figura abaixo, que relaciona a % de enxofre (S) em cada uma das suas formas, em função do valor de pH (Kenneth C. Fugelsang 2007), o pH mantém-se entre os 2,90-3,40 sendo a espécie dominante o bissulfito.

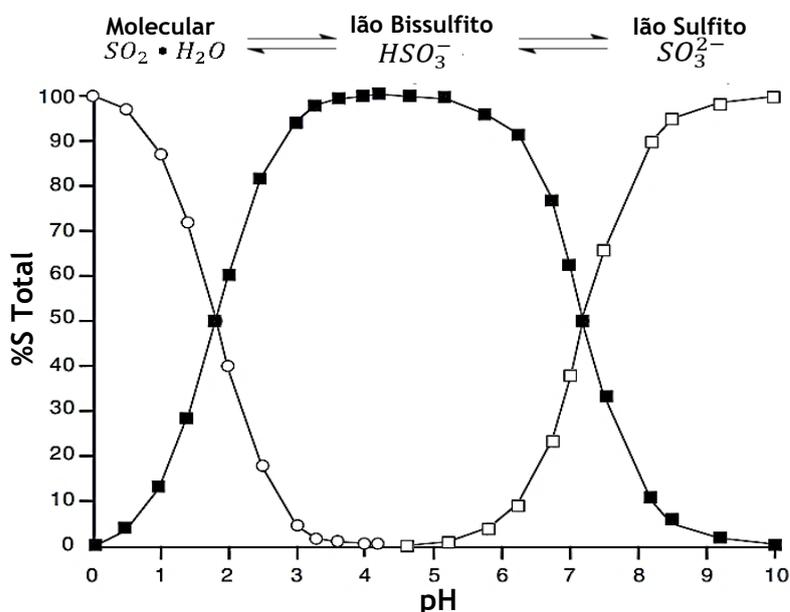


Figura 6- Representação da quantidade total de enxofre (S), em cada uma das suas formas, em função dos diferentes valores de pH, adaptado (Kenneth C. Fugelsang 2007).

Para amuar ou sulfitar o mosto é necessária uma grande quantidade de sulfuroso, ficando este com uma quantidade que varia entre os 500-600 mg/L de SO_2 Total. O objetivo é que o mesmo fique inerte a qualquer tipo de fermentação, por um tempo indeterminado, inibindo assim qualquer tipo de atividade enzimática.

No entanto, para além da função do SO_2 referida acima, este pode funcionar apenas como um inibidor do crescimento de alguns microrganismos prejudiciais ao vinho.

Segundo a legislação (Regulamento CE 607/2009) (IVDP.b)), para vinhos tintos a quantidade máxima de SO_2 permitida é de 150 mg/L e, para vinhos brancos e rosés é de 200 mg/L. Então,

é necessário recorrer ao processo inverso, a dessulfitação do mosto, para que este atinja valores abaixo dos permitidos por lei, uma vez que ainda vai sofrer o processo de fermentação e os valores tendem a aumentar de novo.

2.2.1.1 Dessulfitação

A dessulfitação é um processo que se realiza, essencialmente, com o intuito de remover o SO_2 total e livre presente no mosto amuado¹. Este processo é realizado na quinta da Aveleda não só para que haja a possibilidade da existência de lotes frescos durante todo o ano, mas também porque na época de vindimas não existe capacidade dos tanques de fermentação para todo o mosto produzido a partir de uvas recebidas no centro de vinificação. Ainda para assegurarem uma homogeneidade do mosto, este é misturado com o mosto amuado comprado.

Para que a dessulfitação aconteça, é necessário elevar a temperatura até aos $110\text{-}130^\circ\text{C}$, recorrendo para isso a um permutador de calor. Após o mosto atingir a temperatura pretendida, o enxofre dissolvido transforma-se em vapor, que passa posteriormente na coluna, na direção ascendente, onde existirá a neutralização do SO_2 gasoso através do uso de soda cáustica. Assim é possível obter valores aceitáveis para a quantidade total de sulfuroso (Strassburguer). Através da figura abaixo é possível visualizar parte do processo de forma simplificada (figura 7).

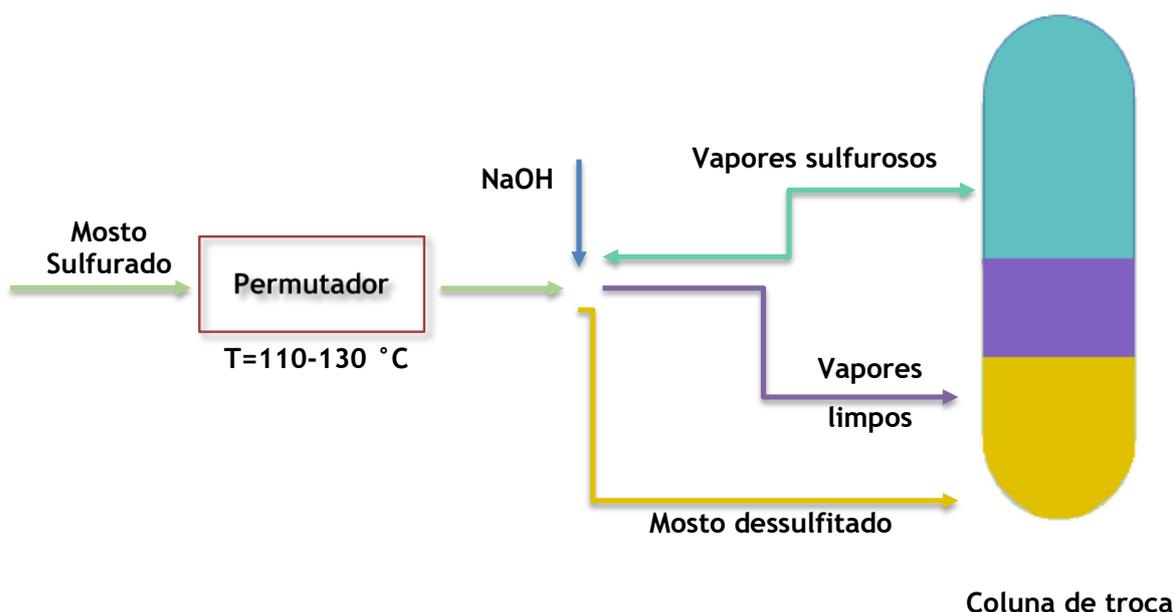


Figura 7- Esquematização simplificada do processo de dessulfitação

¹mosto amuado, mosto cuja fermentação foi temporariamente impedida por qualquer processo, químico ou físico, permitido por lei, como a adição de SO_2 .

O dessulfitor utilizado na Aveleda é de uma empresa alemã, Strassburguer modelo KOL 10000 - 2ND 500, sendo que no anexo A é possível observar toda a sua constituição.

Para o controlo de todo o processo, de forma a garantir que as quantidades de sulfuroso estejam dentro dos limites legais, é necessário o acompanhamento laboratorial, de hora a hora, do mosto que está a ser dessulfitado, para que se algo não esteja de acordo com os limites, os operadores possam verificar e atuar de imediato no processo. As análises são efetuadas no laboratório da Aveleda, segundo o procedimento encontrado no anexo B.

2.3 Hidroximetilfurfural

O HMF (Figura 8), de fórmula química $C_6H_6O_3$, é um aldeído furânico, contendo um anel de furano, um grupo carbonilo insaturado e um grupo hidroxilo alilo, apelidado pela IUPAC como 5- (hidroximetil) furano-2-carbaldeído (PubChem). Este possui um ponto de fusão baixo ($31,5^\circ C$), apresenta massa molar de $126,11 \text{ g/mol}$ e, para além da alta solubilidade em água, é também solúvel em metanol e etanol.

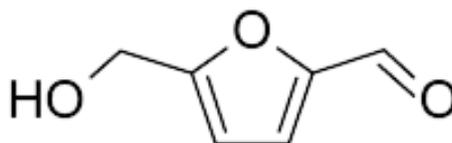


Figura 8- Representação molecular do HMF

Serve, essencialmente, como um indicador de avaliação que compromete a qualidade não só de bebidas, mas também de alimentos, uma vez que promove mudanças na análise sensorial e, quando presente em elevadas quantidades pode também ser prejudicial à saúde do próprio consumidor, segundo estudos já confirmados (Husoy, Haugen et al. 2008). Sempre que em contacto com o ser humano, por demasiado tempo e, em elevadas quantidades (**530 mg/Kg**) (**metabolito SMF**) pode causar dores de cabeça, provocar danos no fígado, afetar o sistema nervoso central ou levar a irritação da mucosa nasal e respiratória. São ainda atribuídos efeitos cancerígenos ao seu metabolito 5-Sulfooximetilfurfural (SMF), principalmente, como potencial iniciador para desencadear o cancro do colón (Abraham, Gurtler et al. 2011, Florian, Bauer-Marinovic et al. 2012).

Esta molécula pode derivar da desidratação de determinados açúcares, nomeadamente hexoses, a temperaturas elevadas num meio com pH ácido (Roman-Leshkov, Chheda et al. 2006). Num primeiro passo, produzem-se intermediários, mas que facilmente eliminam as 3 moléculas de água presentes antes da formação do composto principal, HMF, figura 8 (Kowalski, Lukasiewicz et al. 2013).

A rota de formação pode ser explicada por degradação do açúcar catalisada por ácido (figura 9) (Sampath and Kannan 2013), visto que a reação de *Maillard* - reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato, obtendo um produto que potencia sabor e/ou odor, não é favorecida em meios ácidos. A falta geral de compostos amínicos de azoto no mosto da uva, juntamente com a coagulação proteica como consequência do aumento de temperatura são as outras razões justificáveis para a improbabilidade da ocorrência desta reação (Antonelli, Chinnici et al. 2004).

Contrariamente, existem também alguns estudos que provam que o HMF pode ser formado como um intermediário da reação de *Maillard*, que ocorre quando os carboidratos são aquecidos na presença de aminoácidos ou proteínas (Martins 2001). No entanto, os estudos mais recentes acabam por rejeitar esta hipótese (Saravanan, Park et al. 2018).

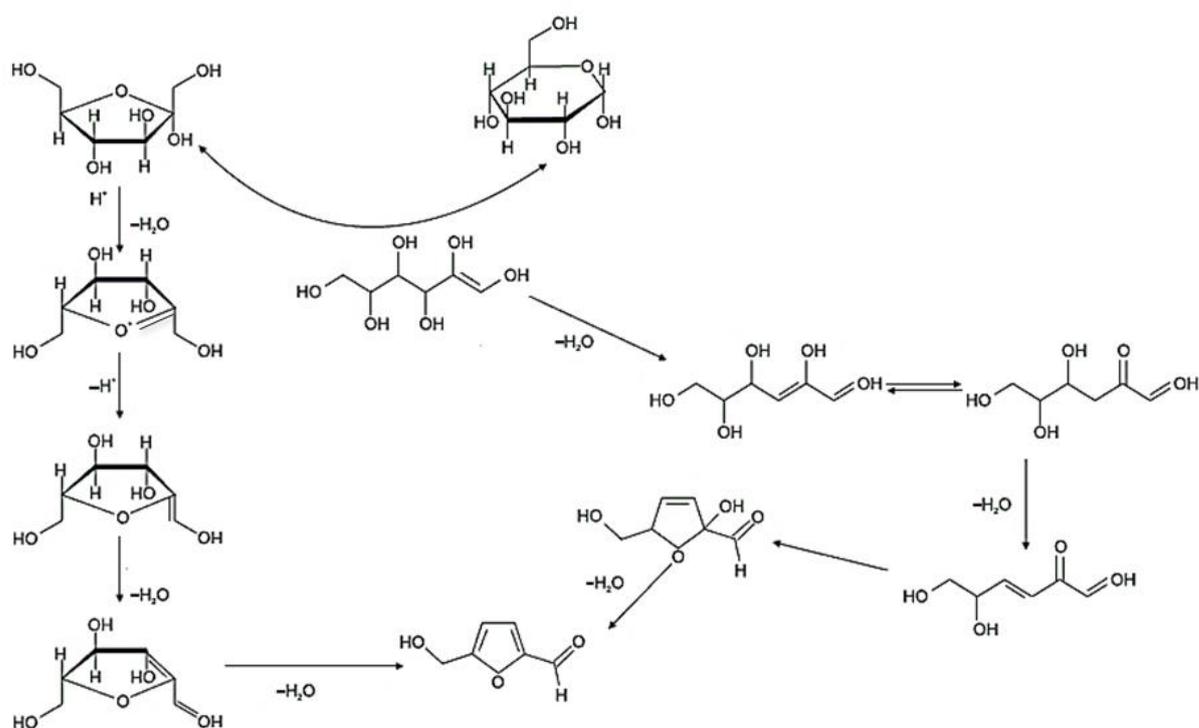


Figura 9- Rota de formação do HMF, tendo a frutose e glicose como substratos primários, adaptado (Capuano and Fogliano 2011, Kowalski, Lukasiewicz et al. 2013).

Portanto, o HMF é facilmente associado a situações de *stress* térmico, em alimentos que contêm açúcar, nomeadamente o vinho, no entanto, é uma molécula ausente em alimentos frescos.

A frutose é a hexose preferida na produção de HMF, uma vez que demonstra ser mais rápida e eficaz a reações de desidratação, quando comparada com outros monossacarídeos, nomeadamente a glicose (Shoemaker 2017).

Esta via de formação da frutose em HMF, é conhecida e estudada desde os finais do séc. XIX, como se pode comprovar pela patente US3118912 (Smith 1964).

Esta formação ocorre em três principais etapas de desidratação, sendo que na parte inicial há a desidratação da furanose no anel C5, prosseguindo com a eliminação de um protão, libertando-se uma molécula de água, fechando assim a primeira ligação dupla no anel de furano, surgindo o grupo carbonilo no C5. A terceira e última desidratação dá a formação final do HMF.

Nos últimos anos, devido às inúmeras investigações, existe cada vez mais uma preocupação atual com a qualidade alimentar, havendo assim uma maior necessidade no controlo analítico, através do uso de marcadores químicos, que avaliam os danos nos alimentos submetidos a sobreaquecimento e armazenamento. Para a garantia de qualidade e segurança, os limites legais de HMF em alguns alimentos já foram impostos pelo Regulamento CE 1493/99 (Europeias 1999).

Por exemplo, no mosto de uvas concentrado o limite é de 25 ppm. O limite legal foi acionado, não só pelas investigações associando o HMF, quando presente em elevadas quantidades, ao aparecimento de algumas doenças (Florian, Bauer-Marinovic et al. 2012), como referido acima, mas também devido ao aparecimento de um aroma torrado associado a uma cor um pouco mais escura, no caso de vinhos (Oliveira e Silva, de Pinho et al. 2008).

3 Materiais e Métodos

3.1 Método Experimental de análise HMF

3.1.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método amplamente usado, que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o tipo mais versátil e mais utilizado de cromatografia de eluição. É particularmente útil para a separação de materiais de grande peso molecular com volatilidade muito baixa. O HPLC utiliza uma fase móvel líquida para separar os componentes da amostra, sendo estes eluídos com o eluente e forçados a passar por uma coluna de alta pressão (Skoog, West et al. 2006)

As análises químicas do HMF foram realizadas no laboratório do Instituto de Vindos Douro e Porto, IVDP, uma vez que a empresa não possui nenhum HPLC no seu laboratório.

As amostras eram devidamente engarrafadas e rotuladas na QA e, posteriormente levadas para o laboratório.

Foi utilizado o HPLC 1200 Agilent, apresentado abaixo, figura 10.



Figura 10- HPLC 1200 Agilent, com detetor DAD

Quanto ao método de determinação do HMF, o IVDP implementou-o com base em algumas referências (Canasa, Belchiora et al. 2003) e pelo método do OIV- *International Organisation of Vine and Wine (OIV.a) 2011*), tendo sido usadas as condições descritas na tabela abaixo:

Tabela 1- Condições de operação do 1200 Agilent para a determinação do HMF.

Detetor	UV/VIS de varrimento (DAD)
Pré Coluna	UHPLC EVO C18 4.6 mm ID
Coluna	C18, Kinetex 5 µm EVO -C18-100 ^a - 4,6×150 mm
λ (nm)	280
Volume Injeção (µL)	10
Fluxo (mL.min⁻¹)	1,3
Temperatura coluna (°C)	40
Tempo de Resposta (min)	65

Usou-se um programa de eluente, sendo que o eluente A constituído por água/ácido fórmico (98:2 v/v) e o eluente B metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v). Na figura 11 é possível observar-se o gradiente utilizado.

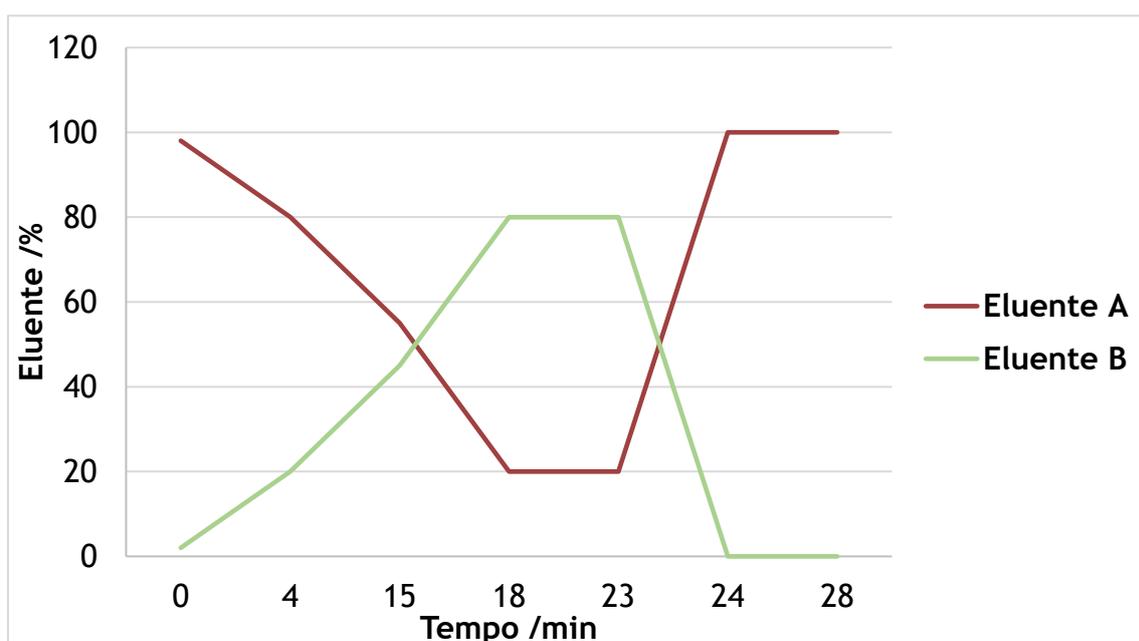


Figura 11- Programa de gradiente utilizado na análise por HPLC, do HMF.

O método foi testado e validado, tendo como limite de deteção 0,02 mg/L, e através de uma curva de calibração com 5 padrões de concentração entre os 0,05 e os 300 mg/L. Para verificar a precisão do método, esta foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia nos padrões e em amostras reais. Os resultados de ambos os parâmetros são dados sob a forma de coeficiente de variação, $CV_T = 0,20 \%$ e $CV_R = 0,14 \%$.

A linearidade do método foi avaliada através da curva de calibração obtida e do coeficiente de determinação, sendo que a equação é dada pela equação 4, com um $R^2=0,9999$.

$$A = 52,82C_{HMF} - 7,4 \quad \text{Equação 4}$$

Já a sensibilidade do método avalia a capacidade deste ser capaz de distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Este parâmetro é definido como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nestas zonas de concentrações, uma vez que existem somente equações de primeiro grau, a sensibilidade corresponde ao declive, sendo que para o composto HMF é dada por 52,8 mg/L.

3.2 Análise Estatística

3.2.1 Design Of Experiments (DOE)

O software *Design Expert 7.0.0* (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) foi utilizado para obter um modelo de experiências/ensaios de acordo com as variáveis em estudo, percebendo de que forma os fatores de entrada podem ser controlados, obtendo um modelo empírico que relacione os fatores com a resposta.

Existem diversos tipos de planeamento, sendo que neste projeto foi utilizado o planeamento fatorial a dois níveis, onde se estudam os fatores a um nível superior e a um nível superior, sendo que a escolha dos níveis depende sempre do operador e das restrições experimentais (Rushing, Karl et al. 2013).

Quanto à análise dos resultados e à significância estatística dos coeficientes da regressão será realizada de acordo com o estudo ANOVA (Diez, Ribeiro et al. 2018). Para valores de p (quantificador da significância de cada fator) igual ou inferior a 0,05 admitimos que os fatores são significativos; já a falta de ajuste, que avalia o grau de ajuste do modelo aos dados experimentais, é desejável que o seu valor de p assuma um valor superior a 0,10, implicando assim que esta não é significativa, o que corresponde a um bom ajuste dos dados experimentais.

Por último, o valor de R^2 convém ser elevado, pois só assim é possível assumir-se que o modelo obtido pelo programa descreve uma boa constituição da resposta.

3.3 Provas Sensoriais

A análise sensorial apenas começou a ser aplicada como ciência, no início do séc. XX, no entanto nos últimos anos tem sido crucial na maior parte das indústrias alimentares. Estas, são desenvolvidas não só para assegurar que os produtos sejam bem-sucedidos quando chegam ao consumidor, como também para que possuam propriedades que vão ao encontro das suas expectativas (Roessler 1965).

De acordo com a norma portuguesa 4263 de 1994, “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos” é a definição atribuída a análise sensorial (Hasdell 2000). Porém, a definição mais consensual a nível mundial, foi apresentada em 1981 pelo *Institute of Food Technologists (IFT)* como “um método científico utilizado para evocar, medir, analisar e interpretar as respostas às reações percebidas pelas visão, olfato, tato, paladar e audição” (Sidel 1993). Frequentemente, as provas realizam-se a meio da manhã ou ao meio dia, uma vez que a acuidade sensorial do provador é máxima quando este sente fome, no entanto quando são provas longas, a sala de provas está aberta o dia inteiro.

A Aveleda tem várias salas de provas, tanto para fazer provas diárias com os enólogos da quinta, como outras para provas mais formais e informais. A sala de provas utilizada foi a que se encontra na fotografia abaixo (figura 12).



Figura 12- Fotografia da sala de provas, Quinta da Aveleda, já com as respetivas garrafas e copos prontos para a prova.

Quanto ao copo de prova este possui elevada importância, a ISO, *International Standards Organization*, publicou o design mais apropriado de um copo para o efeito. A percepção do vinho e a avaliação da cor, são fatores influenciados pelo formato do copo, no entanto é ainda mais importante garantir a sua manutenção e que todos os copos sejam iguais. Por fim, o volume entre 30 mL e 50 mL o aconselhável porque facilita a rotação do vinho no copo (Jackson 2008), figura abaixo.



Figura 14- Fotografia do modelo de copo aconselhado pela ISO



Figura 13- Fotografia da disposição dos copos em prova.

3.3.1 Provas Triangulares

Uma das provas realizadas foi o teste triangular, método discriminativo descrito ao detalhe pela ISO 4120:2004 (Standardization 2004). Os participantes, por ordem de chegada, foram chamados e de seguida foi-lhes entregue o formulário que se encontra no anexo F.1, com todas as instruções necessárias. Cada teste incluía 3 copos, cada um identificado com um código de três letras randomizadas através das funções “CARÁT” e “ALEATÓRIOENTRE” do *Microsoft Excel*, como é demonstrado na figura 15.

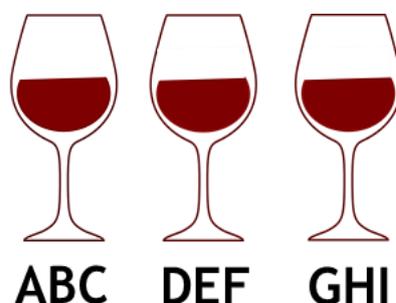


Figura 15- Representação dos copos para o teste triangular, com os respetivos códigos randomizados.

Os resultados foram analisados com base na ISO 4120:2004 e, as respostas foram agrupadas como corretas ou incorretas. Na recolha de dados, escolha forçada, o provador é obrigado a escolher uma das amostras, mesmo não identificando nenhuma diferença, sendo mencionado para identificar em “Observações” se assim acontecesse.

3.3.2 Provas Preferenciais

Este tipo de provas não está estandardizado e, tem como principal objetivo determinar as preferências do consumidor. Desta forma, aos participantes, por ordem de chegada, é-lhes entregue o formulário que se encontra no anexo F.2, sendo que dependendo do teste, tendo dois ou três copos, é necessário organizar de forma preferencial, sendo o número 1 o preferido e o 2 ou 3, respetivamente aquele que menos gostam.

Quanto à análise dos dados é atribuída uma pontuação, no caso de o teste ser de 3 vinhos, de 1 a 3, sendo que a pontuação de 3 é atribuída ao vinho colocado como preferência número 1, sendo que é de mais fácil perceção através do esquema abaixo.

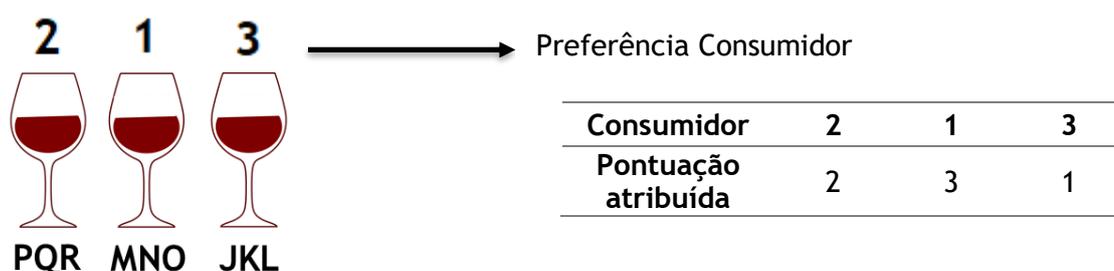


Figura 16- Exemplo de um esquema da atribuição da pontuação na prova preferencial.

4 Resultados e Discussão

O aumento da concentração da molécula de HMF é influenciado por diversos fatores, sendo que foram realizados testes para avaliar a forma como cada um deles influencia diretamente a sua evolução.

A concentração de açúcares no vinho, a % de dessulfitado, as temperaturas de armazenamento e de dessulfitação, os meios de edulcoração e o tempo, foram os fatores essenciais para a realização do estudo. Todos estes foram acompanhados ao longo do tempo por análises analíticas por HPLC sendo que, no estudo de certos fatores ainda foram realizadas provas organoléticas.

Para todos os valores obtidos, foi calculado o respetivo desvio padrão, encontrando-se em anexo C.2. o exemplo de cálculo.

4.1 Concentração de açúcares vs condições de armazenamento

A concentração de açúcares é uma das condições que possui mais influência no aumento da concentração de HMF, uma vez que esta molécula se forma essencialmente através da degradação destes.

Para o estudo em questão, utilizou-se o vinho Quinta da Aveleda, QA, residual, com uma concentração de açúcares conhecida de 1,5 g/L, no entanto, a partir do QA produzido com concentração de açúcares conhecida de 4,72 g/L, foram preparadas posteriormente, com mosto concentrado retificado, MCR, as restantes amostras de concentrações com 10, 20, 40 e 60 g/L. Os exemplos de cálculo para a obtenção destas concentrações se encontram no anexo C.1.

Após a preparação e armazenamento das garrafas para o estudo, recorreu-se à metodologia do HPLC para verificar a quantidade de HMF presente. Foram efetuadas análises a cada duas semanas, usando sempre réplicas em triplicado.

Paralelamente ao estudo da variável mencionada acima, concentração de açúcares, foram também estudadas as condições de armazenamento (20 vs 40°C). Os dados são assim representados abaixo sob a forma de gráficos, (Figura 17 e Figura 18), e encontram-se sob a forma de tabela com o respetivo desvio padrão no anexo D.1, para ambas as temperaturas.

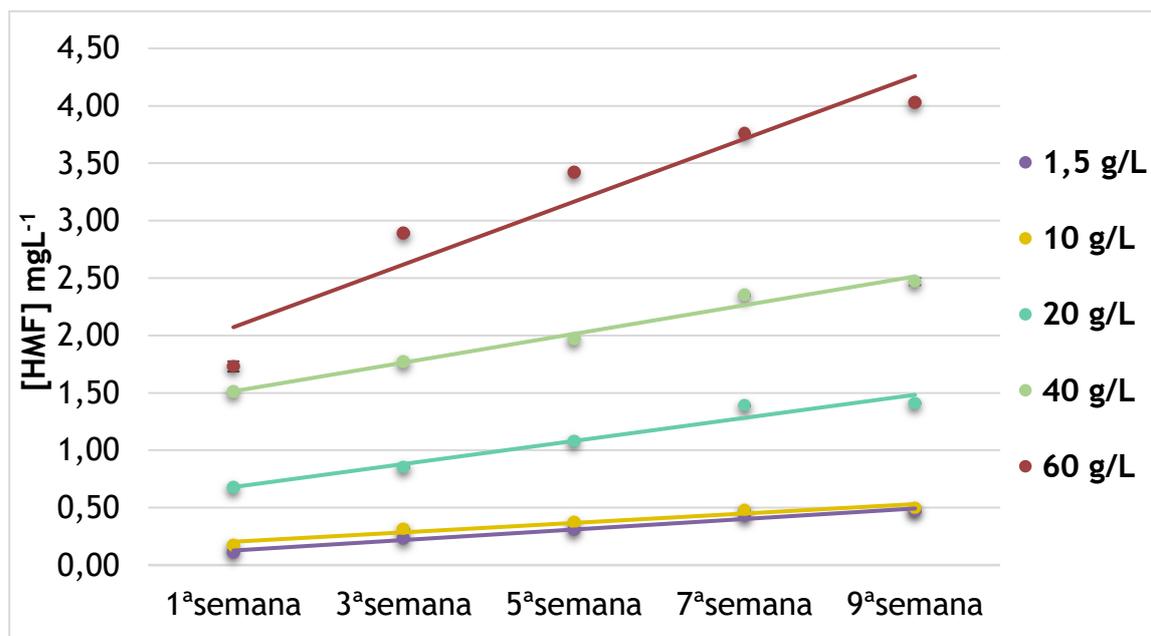


Figura 17 - Concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, a 20 °C, com diferentes concentrações de açúcares (g/L^{-1}), ao longo do tempo.

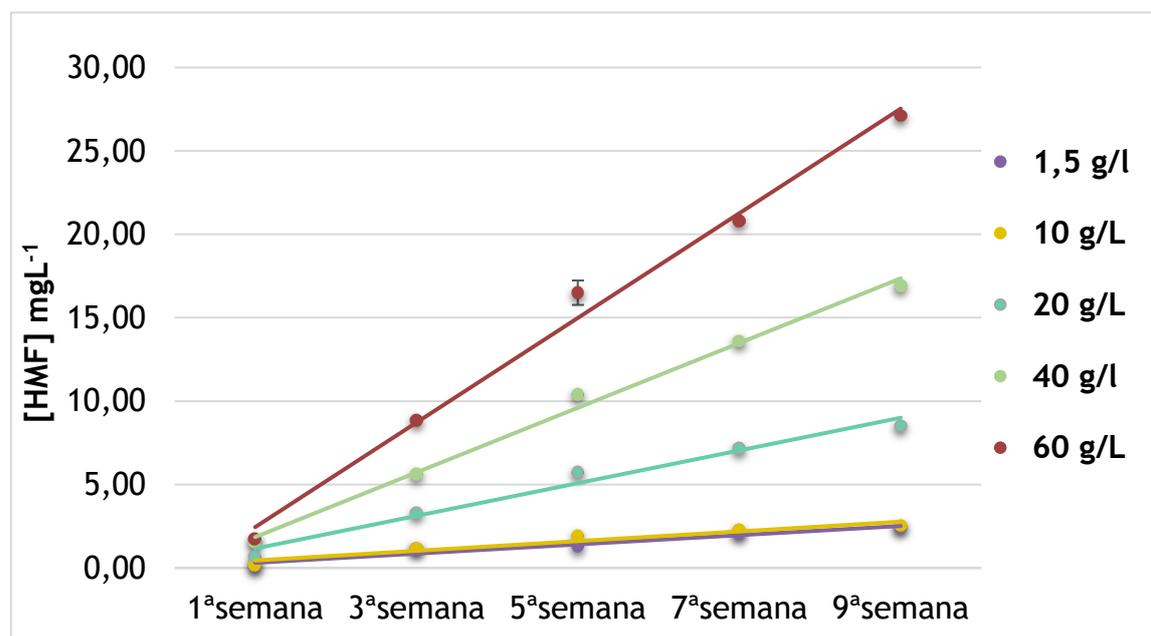


Figura 18 - Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 40 °C, com diferentes concentrações de açúcares (g/L^{-1}), ao longo do tempo.

É notório observar através dos dados acima que, com o aumento da concentração de açúcar presente no vinho, as concentrações de HMF presentes vão aumentando, paralelamente ao que acontece com as condições de armazenamento.

O HMF, pode ser formado como referido precedentemente, por hexoses e também por oligo e polissacarídeos que possam produzir hexoses na sua hidrólise, no entanto sabe-se que o processo a partir das hexoses é mais seletivo. A frutose é mais reativa que a glucose, tendo uma taxa de enolização¹ bastante superior, já que esta é um passo determinante da taxa de formação do HMF. No entanto, o MCR constituído maioritariamente por glucose, demonstra que esta reage igualmente com elevado rendimento, uma vez que, a glucose se isomeriza em frutose, seguido da desidratação de frutose em HMF, preferivelmente nos catalisadores de ácido de Brønsted (Saravanan, Park et al. 2018).

Relativamente à temperatura de armazenamento, o vinho fica sujeito a condições de *stress* térmico que acabam por potenciar a reação de formação do HMF (Xuetong, Lihan et al. 2008). Aliás, observando os gráficos acima, as concentrações para os vinhos que estiveram sujeitos a temperaturas de 40 °C são 6 vezes superiores do que para os vinhos mantidos à temperatura ambiente, sustentado a hipótese referida.

4.1.1 Análise estatística

Recorrendo ao *Design Of Experiments (DOE)*, efetuou-se a análise estatística dos três fatores estudados acima, concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e tempo, em simultâneo.

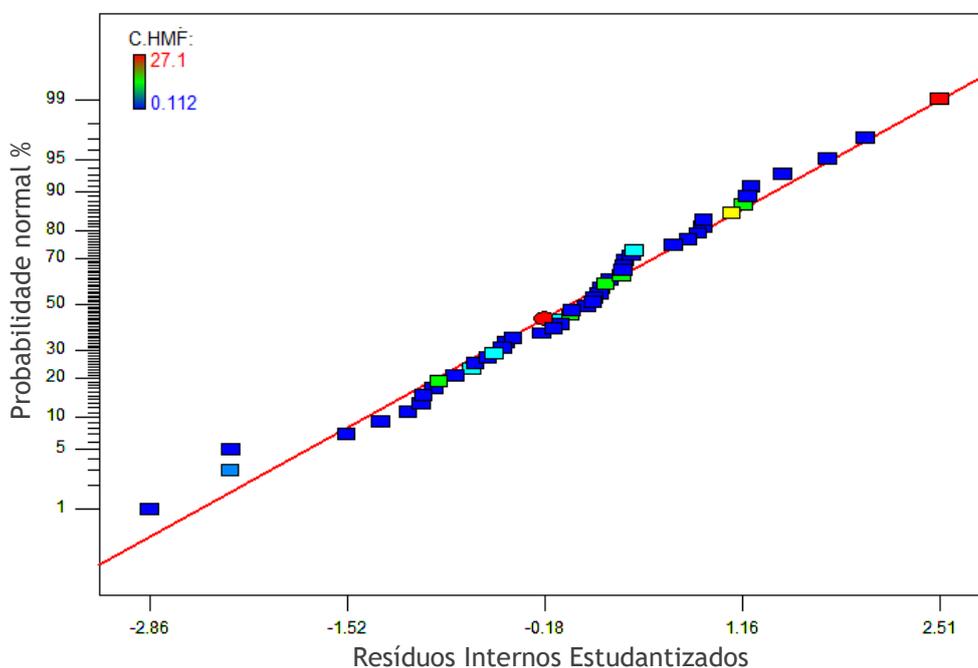


Figura 19- Gráfico da distribuição normal de resíduos, para o estudo da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e tempo.

¹fenómeno catalisado por uma base, onde o anel dos monossacarídeos se abre e produz um enol extremamente instável, que pode formar outros compostos

O gráfico acima afirma o pressuposto de normalidade do modelo. Como todos os pontos dispuseram de forma aleatória ao longo de uma linha reta, confirma-se a suposição de que os resíduos são normalmente distribuídos e de que o modelo é válido para os fatores em estudo.

A influência dos fatores, pode ser estudada através da análise do gráfico de Pareto, evidente na figura 20.

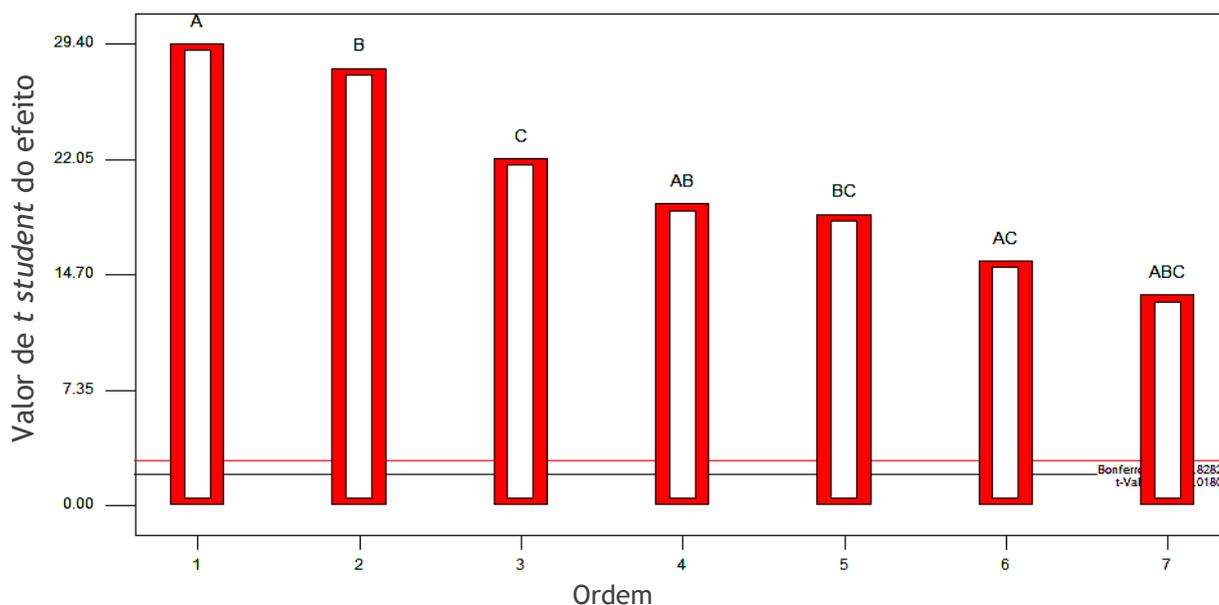


Figura 20- Gráfico da distribuição normal de resíduos, para o estudo da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e tempo

Todas as variáveis presentes são significativas, A-concentração de açúcares; B-temperatura; C-tempo, assim como todas as interações entre elas, visto que todas cruzam a linha de referência, mostrando-se estatisticamente significativas.

A linha de referência mencionada, depende do nível de significância utilizado, $\alpha=0,05$.

Avalia-se ainda a significância estatística do modelo linear pela análise de variância- ANOVA, baseando no teste F (teste de *Fischer*), representado na tabela 2.

Tabela 2- Análise ANOVA para o modelo experimental, concentração de açúcares vs condições de armazenamento

	Valor de F	Valor <i>p</i>
Modelo	411,8	<0,0001
A-Caçúcares	864,3	<0,0001
B- Temperatura	775,2	<0,0001
C-Tempo	487,2	<0,0001
AB	368,3	<0,0001
AC	241,8	<0,0001
BC	344,2	<0,0001
ABC	179,3	<0,0001

Revela-se pelos dados acima que, a regressão é extremamente significativa em termos estatísticos, visto que $p < 0,0001$, apresentado um elevado coeficiente de determinação $R^2 = 0,9856$, explicando cerca de 99% da variabilidade da resposta sendo que apenas os restantes 1% explicam os resíduos. É ainda notório que, os valores de R^2 ajustado e previsto são bastante próximos, 0,9832 e 0,9878. Quanto à análise da importância de cada fator, efetuada a partir do valor de F, repara-se que a variável A assume o controlo, no entanto na variável B, a temperatura de armazenamento também é bastante considerativa.

4.2 Técnicas de edulcoração

Na Quinta da Aveleda, os vinhos podem passar por dois tipos de edulcoração diferentes, MCR ou *Muté*¹ (Wines.com). A principal diferença é na composição destes, uma vez que o MCR como mencionado acima apresenta cerca de 850 g/L de açúcares e o *Muté* apenas contém 175 g/L. O MCR é utilizado essencialmente em sangrias e CG *sweet* enquanto que o *Muté* se utiliza essencialmente em vinhos verdes.

¹Vinho parcialmente fermentado, ou então completamente não fermentado, cuja fermentação foi interrompida pela adição de aguardente

Em vinho QA, prepararam-se lotes de 10, 20, 40 e 60 g/L com MCR e *Muté*, figuras 21 e 22 respetivamente, sendo que foi acompanhada toda a sua evolução ao longo do tempo, por forma a verificar as diferenças evolutivas com cada um dos produtos, e o efeito na formação do HMF. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente média de 18,9°C.

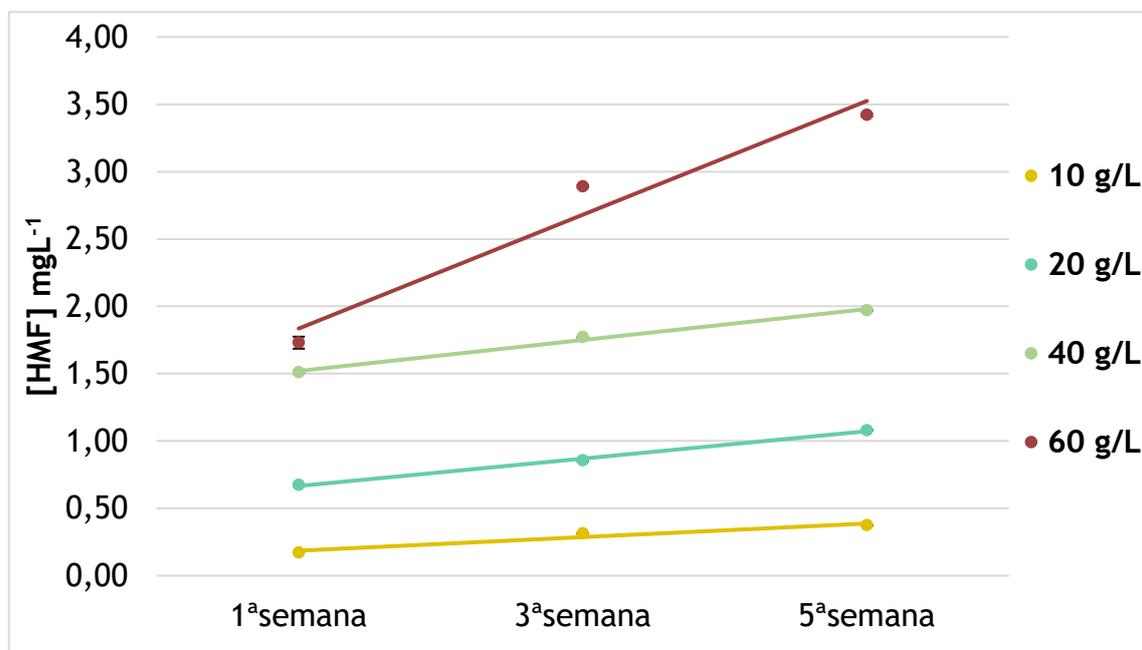


Figura 21- Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 20°C, edulcorados com MCR, ao longo do tempo.

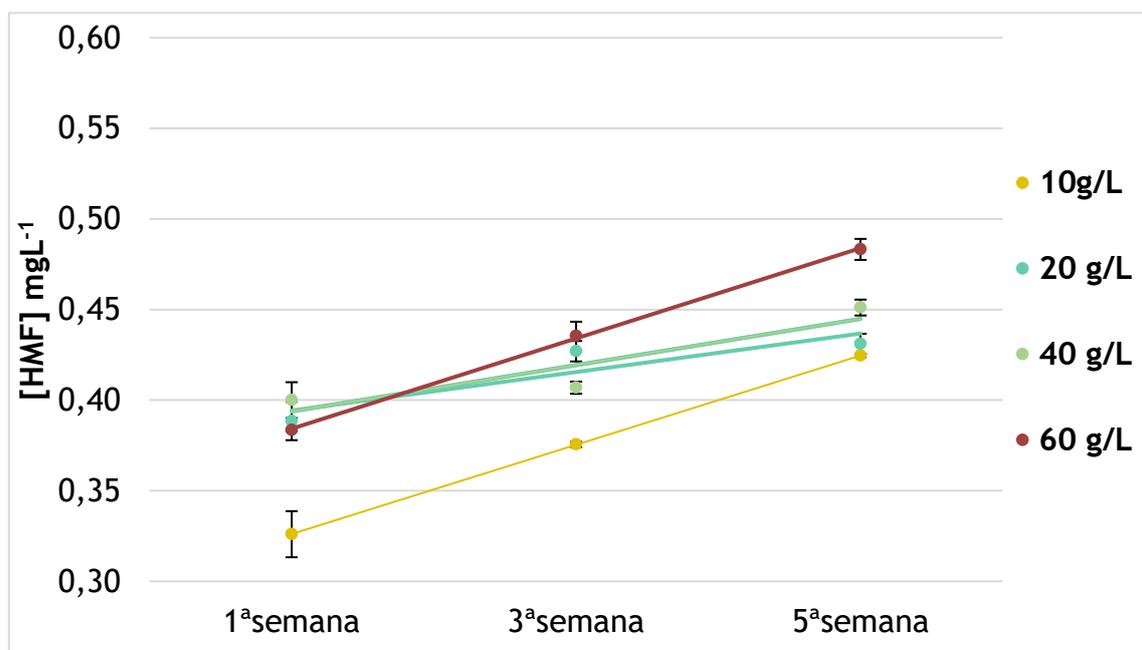


Figura 22- Concentração de HMF (mgL^{-1}) para os vinhos QA, a 20°C, edulcorados com *Muté*, ao longo do tempo.

Analisando as figuras acima, é evidente a diferença significativa entre as duas técnicas de edulcoração. Apesar da constituição do MCR (54% Glucose; 46% Frutose) ser idêntica à do *Muté* (51% Glucose; 49% Frutose), o seu comportamento na formação do HMF é bastante diferente e o vinho evolui quando edulcorado com MCR para um patamar sete vezes mais alto, quando comparado com a outra técnica.

Como o MCR é uma mistura sintética, pode existir algum potenciador que estimule a produção da molécula, contrariamente ao que acontece com *Muté*, que é vinho parcialmente fermentado e a molécula praticamente se manteve estável ao longo das 5 semanas de armazenamento, visto ser uma gama de concentrações bastante baixa, abaixo dos 0,50 g/L.

4.3 Processo de dessulfitação

4.3.1 Percentagem de dessulfitação

Sendo a dessulfitação (D), um processo de elevado stress térmico, sujeito a elevadas temperaturas, a percentagem de mosto dessulfitado (DE) homogeneizada com mosto fresco, irá certamente influenciar a concentração da molécula de HMF encontrada nos vinhos.

Para verificar a viabilidade deste fator, efetuaram-se 3 ensaios com diferentes % de dessulfitado, em vinhos Seco Para Lotes, SPL. Os ensaios foram seguidos continuamente com análises HPLC ao longo do tempo, sendo que a temperatura de armazenamento foi a temperatura ambiente, média de 18,9°C e a temperatura de dessulfitação destes 3 lotes foram os 120°C, a um caudal de 5000 L/h (figura 23).

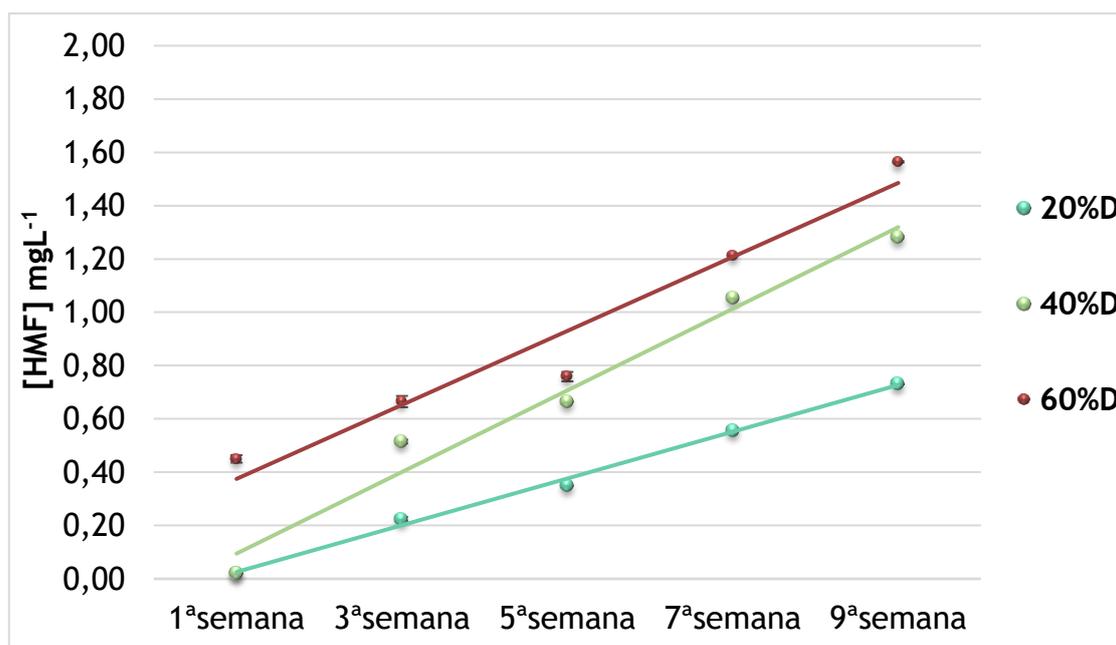


Figura 23 -Concentração de HMF (mgL⁻¹) para os vinhos SPL, com diferentes % D, ao longo do tempo.

A % de dessulfitado é um fator influenciador da concentração de HMF, como já era esperado, uma vez que este processo favorece a passagem do vinho por condições extremas de stress térmico, como as temperaturas elevadas a que o processo é sujeito. Com o aumento da % de dessulfitado, a concentração de HMF tende a aumentar, sendo que este aumento também se vai verificando ao longo do tempo.

A concentração de HMF, ao fim da 9ª semana varia cerca de 0,30 mg/L entre as diferentes % de dessulfitado estudadas, não sendo um valor significativo para que seja necessário repensar o processo de dessulfitação atualmente utilizado e descrito acima.

4.3.2 Temperatura de dessulfitação

O processo de dessulfitação é o processo pela qual o vinho sofre mais impacto, assim, para além da % de dessulfitado a que os lotes foram sujeitos, estudou-se ainda a temperatura a que o vinho foi dessulfitado. Sendo um processo um pouco difícil de controlar, devido aos baixos caudais que têm de se atingir para temperaturas mais baixas, apenas foram conseguidos dois ensaios, a duas temperaturas diferentes, 100 e 120 °C, com um caudal de 3000 L/h e 5000 L/h, respetivamente, figura 24.

Ambos os ensaios foram realizados com uma percentagem de 100 % D, e os lotes foram armazenados à temperatura ambiente, média de 18,9 °C.

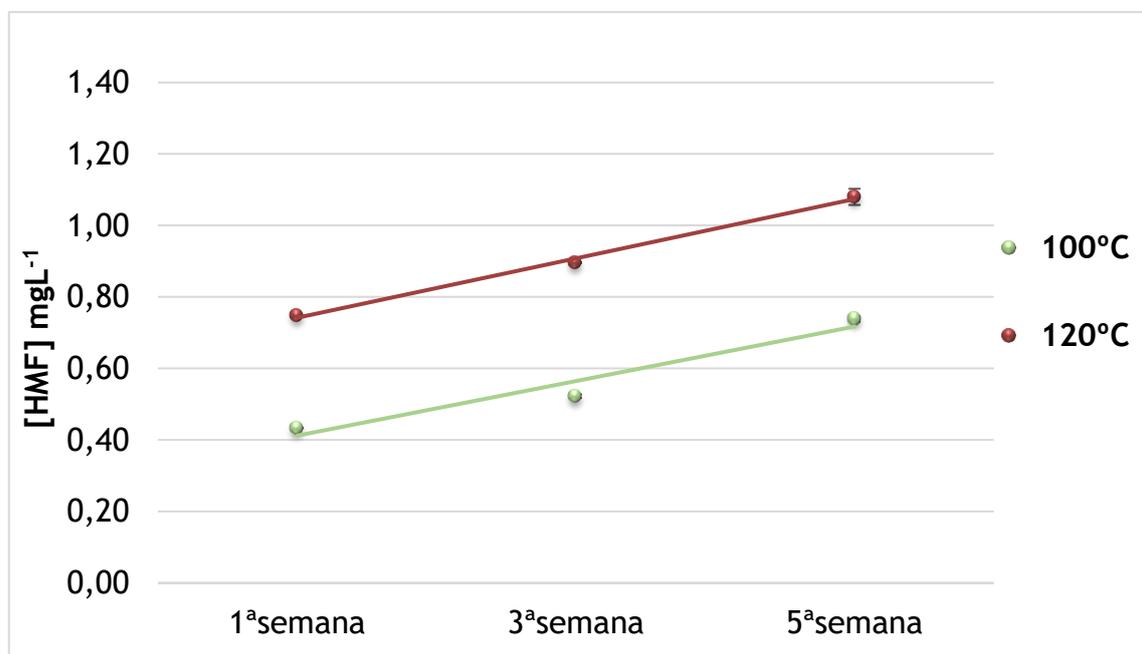


Figura 24- Concentração de HMF (mgL⁻¹) para vinhos SPL 100% DE, a 100 e 120°C, e ao longo do tempo.

Quanto maior a temperatura de dessulfitação, maior é a concentração de HMF ao longo das semanas em estudo, no entanto, a diferença corresponde a cerca de 0,30 mg/L, como acima quando estudado o fator da percentagem de dessulfitação. Então, e tal como já referido, é um valor insignificante para que se repense o processo em questão.

Assim, tanto a temperatura/caudal de dessulfitação, como a percentagem de dessulfitado que está a ser colocada nos lotes, mesmo sendo fatores que influenciam no desenvolvimento da molécula, não são fatores fundamentais na evolução desta. De seguida, recorre-se à análise estatística dos dados pelo DOE, para perceber a influência de cada fator.

4.3.3 Análise estatística

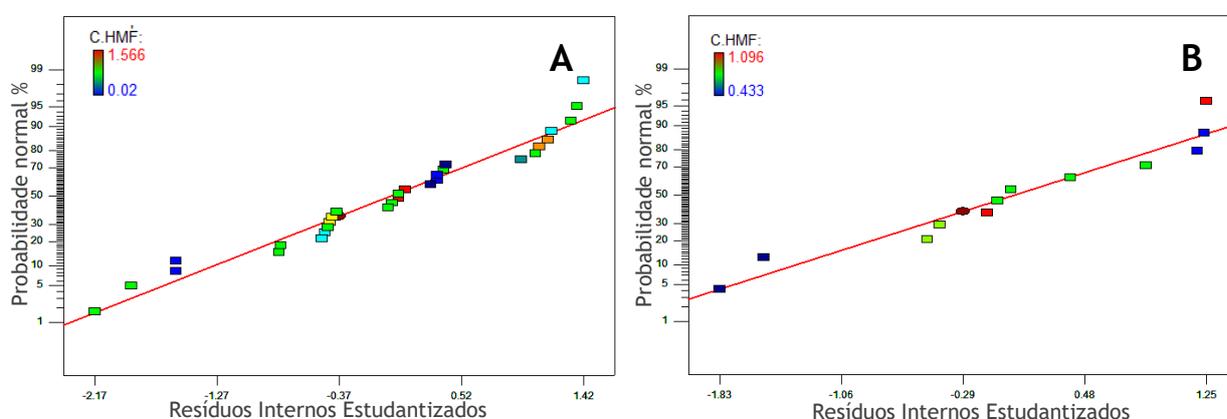


Figura 25- Gráficos da distribuição normal de resíduos, tanto para a % D (A), como para a temperatura de D (B).

O gráfico da distribuição normal dos resíduos confirma o pressuposto de normalidade do modelo. Como todos os pontos se dispuseram de forma aleatória ao longo de uma linha reta, confirma-se a suposição de que os resíduos são normalmente distribuídos e de que o modelo é válido tanto para a % de dessulfitação, como para a temperatura, figura 25A e 25B, respetivamente.

Quanto aos fatores que influenciam a resposta, tanto para a %, como para a temperatura de dessulfitação, estes foram determinados a partir do gráfico de distribuição normal, figura 25. A seleção dos fatores é efetuada de modo a que a linha representada passe pela maioria dos pontos referentes aos fatores cujos efeitos padronizados são próximos de zero. Assim, os pontos mais afastados da linha, serão os pontos a incluir no modelo.

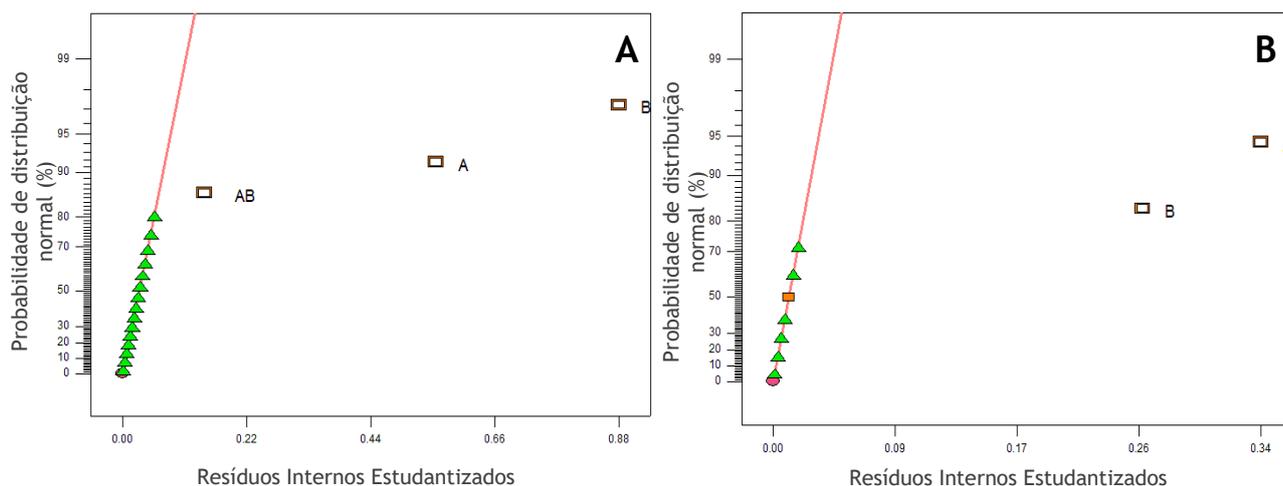


Figura 26- Gráficos da distribuição normal de resíduos, após a seleção dos fatores significativos, tanto para a % D (A), como para a temperatura de D (B).

Pela análise da figura 26A, para a % DE todos os fatores principais são significativos, bem como a interação entre eles. Quanto à temperatura de D (figura 26B), apenas se consideram significativos os fatores principais, sem consideração da interação entre eles. Assim, é evidente que todos os fatores influenciam a resposta, sendo que o grau de importância é avaliado com mais detalhe pela análise ANOVA.

Quanto à análise ANOVA do modelo e dos fatores em causa, os valores obtidos foram os seguintes:

Tabela 3- Análise ANOVA para o modelo experimental, % D.

	Valor de F	Valor <i>p</i>
Modelo	192,3	<0,0001
A-% Dessulfitação	161,4	<0,0001
B- Tempo	404,6	<0,0001
AB	11,0	0,0028
Curvatura	$8,67 \times 10^{-3}$	0,9265

Para a %D todas as variáveis se assumem significativas visto $p < 0,0001$, com uma regressão linear de $R^2 = 0,9585$. O fator com maior impacto será a temperatura de D, sendo que o tempo não assume uma grande discrepância quando comparado com o fator principal. O modelo apresenta curvatura, no entanto esta é não significativa, $p > 0,05$, não significando a não linearidade do modelo.

Os valores de R^2 ajustado e previsto assumem valores próximos, 0,9535 e 0,9467, indicando uma boa linearidade do método.

Por fim, efetua-se a análise relativamente à resposta temperatura D (tabela 4).

Tabela 4- Análise ANOVA para o modelo experimental, temperatura D.

	VALOR DE f	VALOR P
Modelo	369,5	<0,0001
A-T Dessulfitação	469,4	<0,0001
B-Tempo	269,6	<0,0001
Falta de Ajuste	20,52	0,0015

Ambos os fatores se assumem significativos, no entanto quanto à sua interação o mesmo não se observa. A Temperatura de dessulfitação assume um grande impacto, neste caso bastante superior ao fator tempo. Quanto à falta de ajuste significativa, pode ser essencialmente pelo efeito de um bloco significativo, que se constata também pela discrepância que existe entre os valores do R^2 previsto e ajustado, 0,9853 e 0,9598.

4.4 Técnicas de produção

Entre todos os fatores, que podem afetar a [HMF], questionam-se também as diferentes técnicas de produção dos diferentes vinhos produzidos na Aveleda. Assim, efetuou-se o teste em produto acabado, produto que já passou por todas as etapas de vinificação, encontrando-se no armazém em *stock*, para posterior distribuição.

Os vinhos selecionados, foram o CG Base, Rosé, *Sweet* tanto o de 40g/L, como o de 60g/L, QA, Aveleda Alvarinho e Aveleda Loureiro 4g/L, bem como o de 8g/L.

4.4.1 Casal Garcia

O Casal Garcia, número um dos produtos da quinta da Aveleda, foi estudado, agora como produto em *stock*, tanto o CG base com gramagem de açúcar de 11 g/L, bem como o CG *sweet*, de gramagem de açúcar e 40 e 60 g/L

Na figura 27 apresenta-se a evolução do HMF, para o CG Base, enquanto que na figura 28 observa-se a evolução no CG *Sweet* 40 e 60 g/L, ambas as gamas de CG sujeitas a duas temperaturas de armazenamento, 20 e 40°C

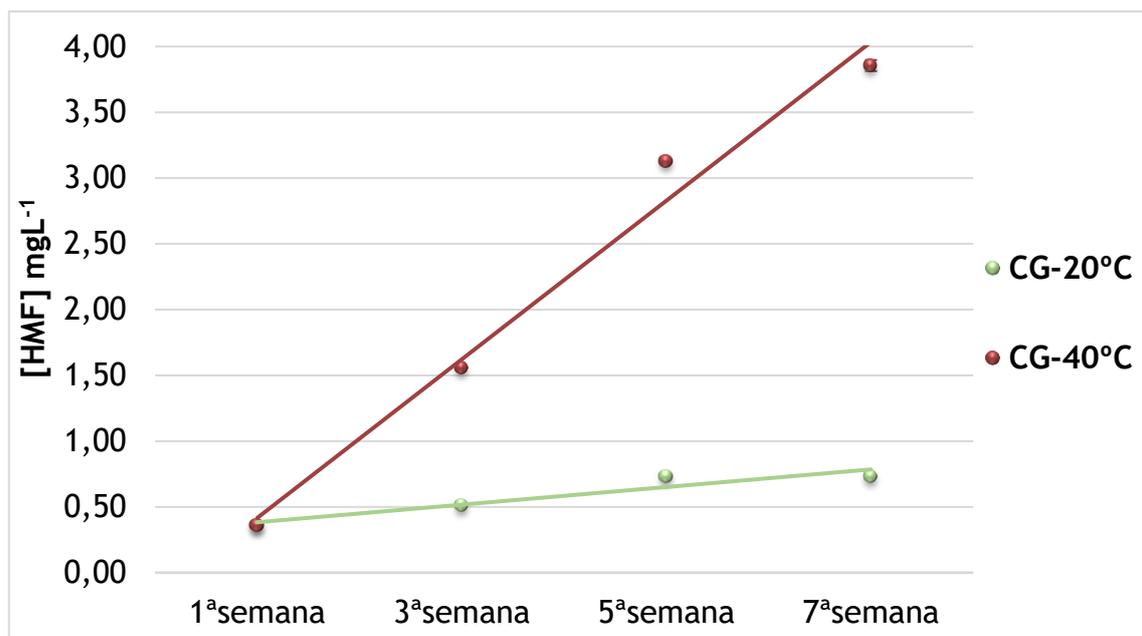


Figura 28- Concentração de HMF (mgL⁻¹) em CG Base, a 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

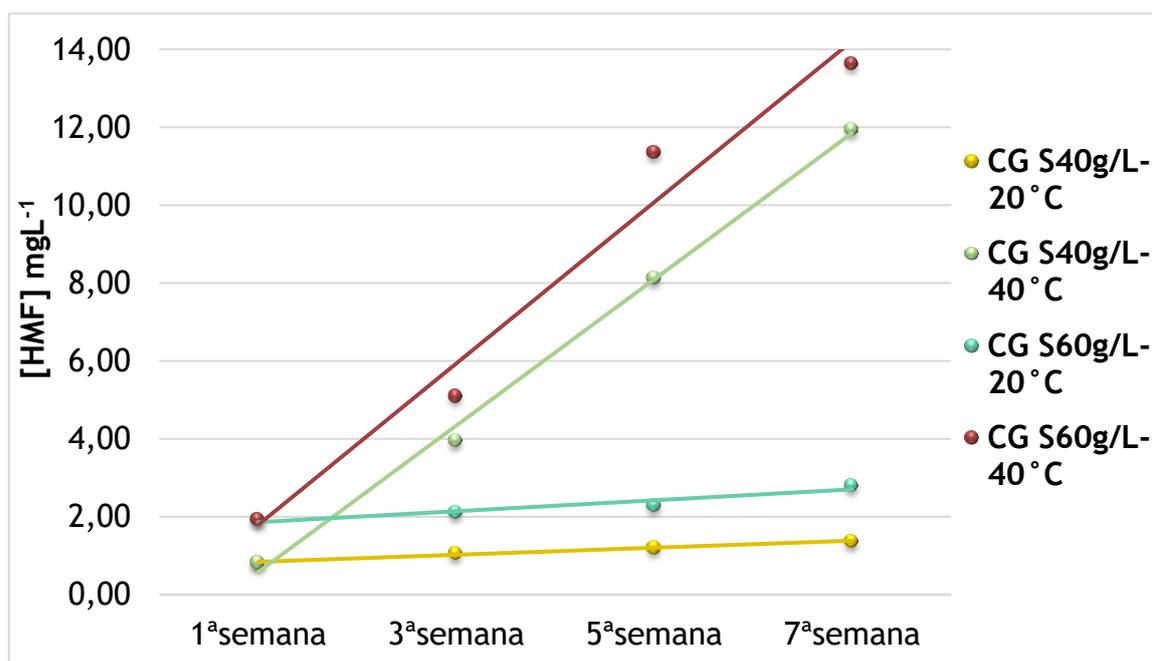


Figura 27- Concentração de HMF (mgL⁻¹) em CG Sweet 40 e 60 g/L, a 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

Da análise de ambas as figuras acima são evidentes as diferenças quando os vinhos são sujeitos a condições de temperatura extremas, neste caso os 40 °C, sendo esta diferença na ordem dos 3 mg/L para o CG Base e de 10 mg/L para o CG *Sweet*

Ainda assim, quando apenas se analisa a figura 28, em que a variável da concentração de açúcar também está presente, é possível, mais uma vez, perceber que este é um fator determinante na evolução do composto.

Visivelmente, torna-se ainda possível concluir que quando os vinhos estão sujeitos à temperatura ambiente, após algumas semanas a evolução da molécula começa a ser praticamente constante, fenómeno observável para ambos os CG, indicador de que a molécula deixou de ter açúcares disponíveis para se continuar a formar.

4.4.2 Aveleda

Na categoria de vinhos Aveleda, destacam-se o Quinta da Aveleda, os Loureiro e o Alvarinho, sendo que em todos estes foi acompanhado a evolução da molécula HMF. Nenhum deles é sujeito ao processo de dessulfitação, ou seja, não são produzidos a partir de mosto amuado.

Quinta da Aveleda

O QA, um clássico, mistura de castas Loureiro e Alvarinho, com quantidades de açúcar residual, tendo sido sujeito a duas temperaturas de armazenamento diferentes, 20 e 40 °C, e a evolução da molécula acompanha ao longo de 7 semanas (figura 29).

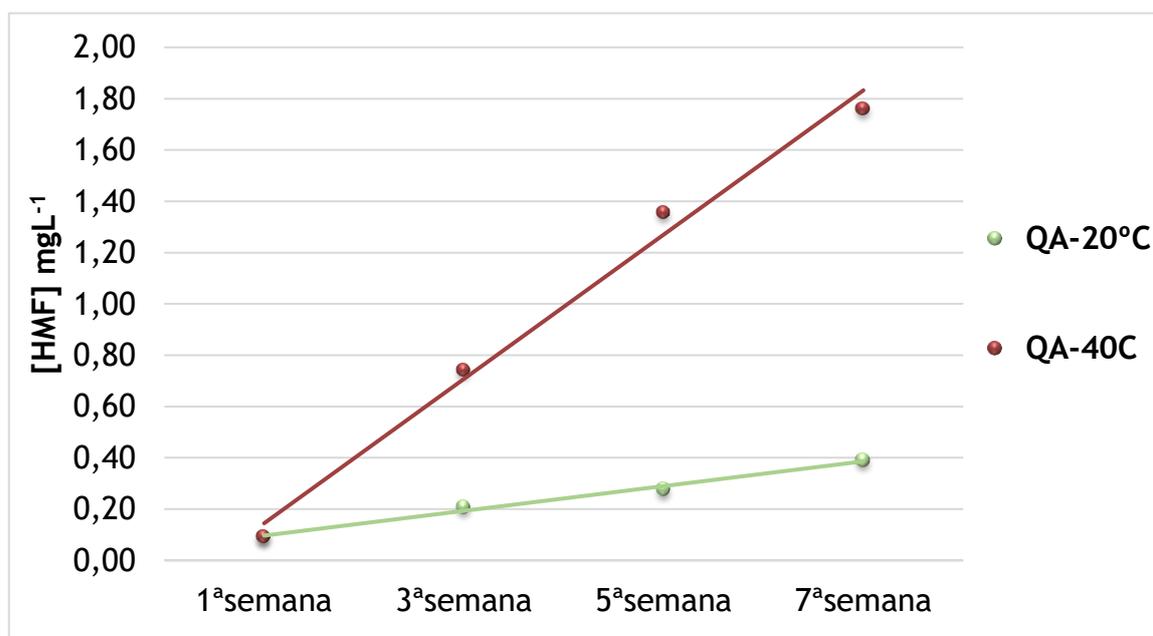


Figura 29- Concentração de HMF (mgL⁻¹) no vinho QA, a 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

No gráfico acima, é de fácil percepção, mais uma vez, que a concentração de HMF evolui muito mais rapidamente e para gamas bastante mais altas, 4 vezes superior, quando a temperatura de armazenamento se situa nos 40 °C. No caso da temperatura ambiente, a concentração de HMF aumenta pouco e de uma forma mais constante, tendo tendência a estabilizar.

Aveleda Loureiro

Relativamente ao Aveleda Loureiro, de castas como o próprio nome indica Loureiro, é comercializado pela Aveleda com duas gramagens de açúcar diferentes, 4 e 8 g/L. Efetuou-se o estudo nas duas temperaturas já estudadas acima e acompanhou-se a evolução da molécula (figura 30).

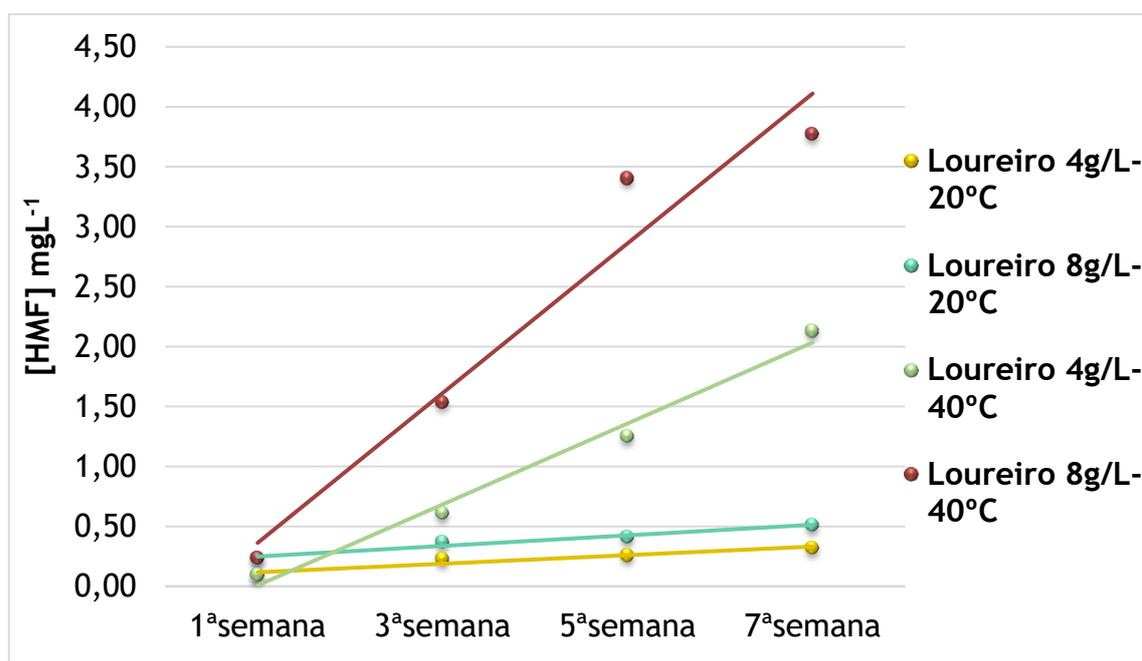


Figura 30- Concentração de HMF (mgL^{-1}) no vinho Aveleda Loureiro 4 e 8 g/L açúcar, a 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

Os resultados são os já observados no ensaio anterior (figura 28), ou seja, quando a gramagem de açúcar é superior, as concentrações de HMF são bastante superiores e quando sujeitos a temperaturas ambiente, o aumento é muito menor, tendendo a estabilizar ao final de algumas semanas.

Aveleda Alvarinho

Quanto ao Aveleda Alvarinho, de castas Alvarinho, é comercializado pela Aveleda com açúcar residual. A evolução da molécula neste vinho é visível abaixo (figura 31).

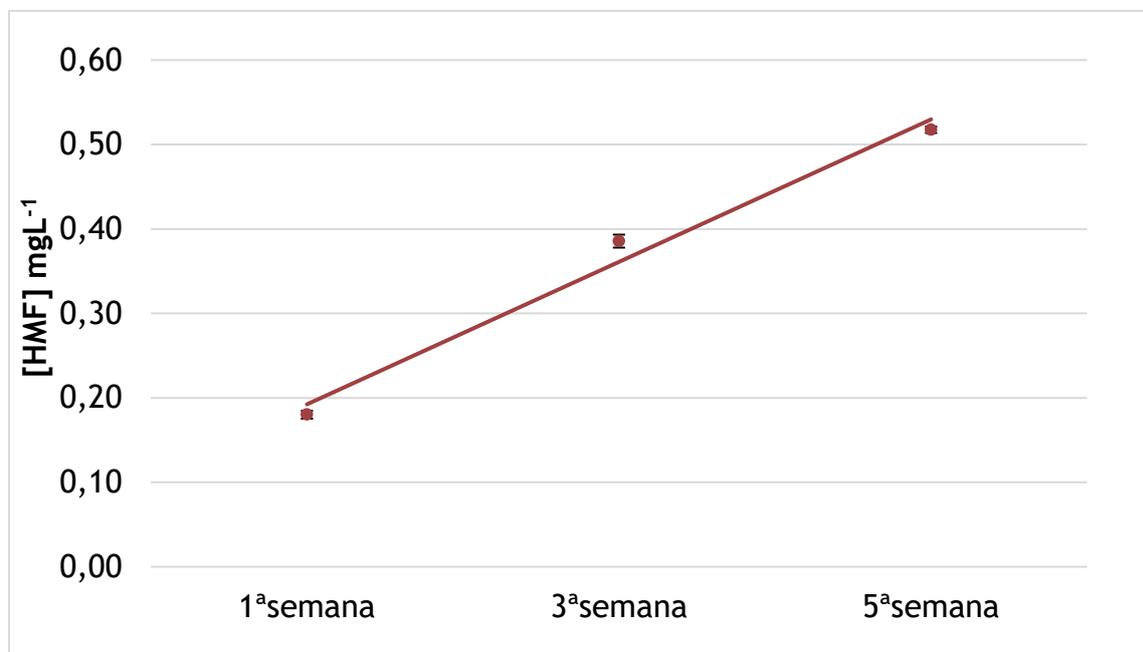


Figura 31- Concentração de HMF (mgL⁻¹) no vinho Aveleda Alvarinho a 20 °C, ao longo do tempo.

De modo similar aos outros vinhos, este vinho apresenta quantidades de HMF baixas e evolui, praticamente, da mesma maneira que todos os vinhos Aveleda. As gamas que apresenta são bastante baixas e ao final da 5ª semana a concentração ronda os 0,50 mg/L.

4.5 Provas sensoriais

As provas organoléticas foram realizadas com o intuito de tentar perceber os limiares de percepção do HMF no vinho, e determinar ainda se as diferenças de concentração são significativas, detetadas e aceites ou não pelo consumidor, visto não existirem estudos acerca desta molécula no vinho, não se sabendo assim as gamas em que esta será detetada. Efetuaram-se dois tipos de provas distintas, prova triangular e preferencial, sendo que foram ambas realizadas duas vezes, com vinhos diferentes e com diferentes concentrações da molécula em estudo, HMF.

4.5.1 Provas triangulares

4.5.1.1 1ª Prova

Previamente foram determinadas as concentrações de HMF nos vinhos levados a prova, QA, CG e CG Rosé, sendo que foram obtidas as seguintes concentrações, 0,092, 0,36 e 1,1 mg/L, respetivamente, indicando que seriam necessários 3 testes triangulares. De seguida, foi imposto a cada vinho solução de HMF, de modo a que estes ficassem com concentrações de 1,00, 2,00, e 3,00 mg/L, sendo que os cálculos efetuados para se obterem estes resultados se encontram no anexo C.4.

Através da ISO 4120 (Standardization 2004), fez-se uma abordagem estatística para se perceber o número de provadores que seriam necessários para o teste. Sendo α , a probabilidade de concluir que existe uma diferença perceptível quando uma pessoa não nota, β , a probabilidade de concluir que não existe diferença perceptível quando esta existe e p_d a proporção de avaliações em que uma diferença perceptível é detetada entre os dois produtos.

Definiu-se um risco α de 5%, β de 5%, e p_d de 50%, e pela tabela F1 presente no anexo F, verificou-se que seriam necessários 23 provadores para que o teste tenha 95% de hipótese de detetar que pelo menos 50% dos avaliadores possam detetar uma diferença nas amostras.

Cada provador teria de preencher na ficha de prova, anexo 5, os códigos de 3 letras apresentados em cada copo e assinalar com um “X” o vinho que consideraria diferente. Para um número total de 23 provadores, os resultados obtidos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5- Apresentação dos resultados das provas triangulares para os 23 provadores

Vinhos	Nº RESPOSTAS CERTAS	Nº RESPOSTAS ERRADAS
QA	10	13
CG Rosé	11	12
CG Branco	11	12

Posteriormente, analisando os resultados obtidos através da ISO 4120:2004, com base na tabela presente no anexo F2, obtém-se o número mínimo de respostas corretas requeridas para um nível de significância declarado, correspondente ao número de avaliadores, neste caso os 23. Assim, para um $\alpha=0,20$, o número de provadores necessário para que se notem diferenças significativas entre as amostras é de 11, podendo então testemunhar que tanto o CG rosé, como

o CG base apresentam essas mesmas diferenças significativas, no entanto o QA apenas apresentou um painel de provadores com resposta correta de 10.

Ainda com base na norma mencionada acima e, para uma análise mais detalhada para cada um dos vinhos, calcularam-se os intervalos de confiança sobre a proporção da população que pode distinguir as amostras, através das equações presentes no anexo C.4.

Casal Garcia Rosé e Branco

Para o CG Rosé e Branco os resultados foram os mesmos, visto que o número de respostas corretas foram os mesmos, 11, obtendo os resultados abaixo (tabela 6).

Tabela 6-Resultados da 1ª prova triangular, para os vinhos CG Rosé e Branco.

p_c	0,48
p_d	0,22
σ_d	0,16
LC_s	0,35
LC_i	0,086

Com 80% de confiança, pode afirmar-se que a proporção real da população que poderia distinguir não é mais que 35%, por outro lado como o limite inferior de confiança é superior a 0 e $p_d = 0,22$ está no intervalo, e é, portanto, um valor possível, rejeita-se a hipótese de existir alguma diferença entre as amostras.

Por outro lado, todos os intervalos de confiança permitem 10% de erro, assumindo que a verdadeira proporção de distinguidores estará entre os 8,6 e 35%, suportando que as diferenças ainda que existam, serão mínimas para estas concentrações de HMF.

Quinta da Aveleda

Para o QA, os resultados estão abaixo (tabela 7), considerando as 10 respostas corretas.

Tabela 7- Resultados da 1ª prova triangular, para os vinhos QA.

p_c	0,43
p_d	0,15
σ_d	0,16
LC_s	0,28
LC_i	0,022

Assim, com 80% de confiança, também se pode afirmar que a proporção real da população que poderia distinguir não é mais que 28% e, como o limite inferior de confiança é de 0,22 e o limite superior de 0,28, o valor de 0,15 pertence ao intervalo, sustentando a conclusão já vista acima de que as diferenças não seriam significativas e, apenas com 10% de erro dos limites se pode considerar que os distinguidores estarão entre os 2,2 e os 28%.

4.5.1.2 2ª Prova

Uma vez que através da 1ª prova não foi possível identificar os limiares de percepção da molécula, foi necessário efetuar uma 2ª prova. Assim, deste modo, foram impostas concentrações de HMF bastante superiores às utilizadas na prova anterior. Por limitações do vinho já disponível, uma vez que todo o vinho foi armazenado no início do estudo, utilizou-se apenas QA de 40 e 60 g/L de açúcares, com [HMF] de 2,47-10,0 mg/ e 4,03-8,01 mg/L, respetivamente, exemplos de cálculo no anexo D.2.

Novamente, através da ISO 4120, se a chance fosse de 95% teria de se conseguir um painel de 23 provadores. Contudo, não foi possível este número de provadores, e a 2ª prova foi efetuada apenas com 16. Assim, para este valor, foi necessário atualizar os valores pré-definidos, que passou a ser de 80% a chance de detetar que pelo menos 50% dos avaliadores possam detetar uma diferença nas amostras.

Calcularam-se novamente os intervalos de confiança para os 2 testes triangulares efetuados sobre a proporção da população que pode distinguir as amostras (equações em anexo C.4).

QA 40 mg/L

Para o QA 40 mg/L, com 12 respostas corretas foram obtidos os valores apresentados na tabela 8.

Tabela 8- Resultados da 2ª prova triangular, para o vinho QA 40 mg/L.

p_c	0,75
p_d	0,63
σ_d	0,16
LC_s	0,76
LC_i	0,49

Para um nível de confiança de 80%, assegura-se que a proporção real da população que poderia distinguir as amostras é de 76%. No entanto, o valor de $p_d = 0,63$ não permite que a hipótese de não existir alguma diferença seja totalmente rejeitada, porém há um intervalo de confiança bastante maior, entre os 49 e os 76% de assumir que as diferenças sejam mais significativas, admitindo que o limiar de perceção esteja mais próximo das concentrações trabalhadas, <10 mg/L.

QA 60 mg/L

Relativamente ao QA 60 mg/L, obtiveram-se os resultados seguintes (tabela 9), sendo 6 o número de respostas corretas.

Tabela 9- Resultados da 2ª prova triangular, para o vinho QA 60 mg/L.

p_c	0,38
p_d	0,06
σ_d	0,18
LC_s	0,22
LC_i	-0,09

Novamente com um nível de confiança de 80%, só 22% é a proporção real da população que poderia distinguir as amostras, sendo que por este valor ser tão baixo, a hipótese que existirá alguma diferença será rejeitada pelo facto de p_d pertencer aos intervalos de confiança.

Talvez como a gramagem de açúcares é bastante alta, estes sabores se tenham sobreposto ao do HMF, sendo mais difícil de detetar a amostra com mais quantidade.

As provas triangulares permitiram concluir que as concentrações trabalhadas abaixo dos 10 mg/L serão concentrações abaixo do limiar de percepção do HMF, sendo assim necessário complementar a informação com as provas preferenciais, que serão um indicador de mais alguma informação.

4.5.2 Provas preferenciais

Tal como aconteceu nas provas triangulares mencionadas acima, nas provas preferenciais também foi necessária a prévia análise da concentração de HMF presente, para numa fase posterior ser possível impor a cada vinho solução de HMF, de modo a que estes fiquem com as concentrações pretendidas.

4.5.2.1 1ª Prova

Para a 1ª prova preferencial, o teste foi efetuado em QA com três concentrações diferentes de HMF, 0,092; 1,00 e 2,00 mg/L e, CG Base, 0,359; 1,00 e 2,00 mg/L. Foi possível obter um painel de 23 provadores. Visto não existir qualquer norma relativa a prova preferencial, toda a análise foi efetuada segundo os métodos da Avelada SA. para este tipo de prova.

Quinta da Avelada

Na tabela 10 são apresentados os resultados relativos ao 1º teste da 1ª prova preferencial.

Tabela 10- Resultados da 1ª prova preferencial, para o vinho QA

[HMF] mg/L	0,092	1,00	2,00
Nº vezes + preferido	8 (23)	5 (23)	8 (23)
Nº vezes - preferido	5 (23)	9 (23)	9 (23)

No teste acima, trabalharam-se gamas de concentrações de HMF muito baixas o que, pela conclusão do teste triangular, permite afirmar que o limiar de percepção do composto é acima destas gamas. Assim sendo, os resultados acima indicam isso mesmo, uma irregularidade, visto que o vinho de elevada concentração de HMF tanto é o que o consumidor mais prefere, como o que menos prefere. Contudo, pode supor-se que o vinho com a concentração mais baixa é o preferido, uma vez que foi o vinho escolhido como 1ª opção um maior número de vezes e foi o menos escolhido como o que o consumidor menos aprova.

CG Base

Na tabela abaixo são apresentados os resultados relativos ao 2º teste da 1ª prova preferencial.

Tabela 11- Resultados da 1ª prova preferencial, para o vinho CG Base

[HMF] mg/L	0,359	1,00	2,00
Nº vezes + preferido	4 (23)	9 (23)	10 (23)
Nº vezes - preferido	4 (23)	7 (23)	8 (23)

Apesar da incoerência dos resultados obtidos nesta prova, que utilizou uma gama de [HMF] um pouco acima da que foi trabalhada no 1º teste, verificou-se que a concentração mais alta continua a ser a mais preferida, no entanto é também a menos preferida.

Com ambos os testes, a conclusão torna-se clara, o limiar de percepção do HMF não está incluído nesta gama de concentrações, sendo por isso necessária a realização de uma 2ª prova com gamas mais elevadas.

4.5.2.2 2ª Prova

QA 20 g/L

Na 2ª prova preferencial, apenas se efetuou um teste e foi com vinho QA com 20 g/L de açúcar, sendo que a concentração de HMF era de 1,41 g/L e foi imposta uma de 15,0 mg/L.

Com um painel um pouco mais reduzido, 16 provadores, os resultados obtidos são mostrados abaixo (tabela 12).

Tabela 12- - Resultados da 2ª prova preferencial, para o vinho QA 20 g/L.

[HMF] mg/L	1,41	15,0
Nº vezes + preferido	11 (16)	5 (16)
Nº vezes - preferido	5 (16)	11 (16)

Após esta prova, os resultados são bastante mais elucidativos, uma vez que o vinho com a concentração mais alta de HMF é o menos preferido em quase 70% dos provadores, o que indica que provavelmente o limiar de percepção do consumidor para o composto estará próximo destas quantidades sendo que, quando presente nesta gama de concentrações, o provador rejeita, optando pelo vinho inalterado, com as concentrações mais baixas.

4.6 Vinhos Concorrentes de Mercado

Com o propósito de perceber em que situação a Aveleda se encontra com os seus vinhos, com respeito ao composto HMF, foi efetuado um estudo dos vinhos concorrentes de mercado (Figura 32). Foram analisados 6 vinhos, tendo em conta que 4 deles são vinhos verdes e 2 são verdes Rosé.

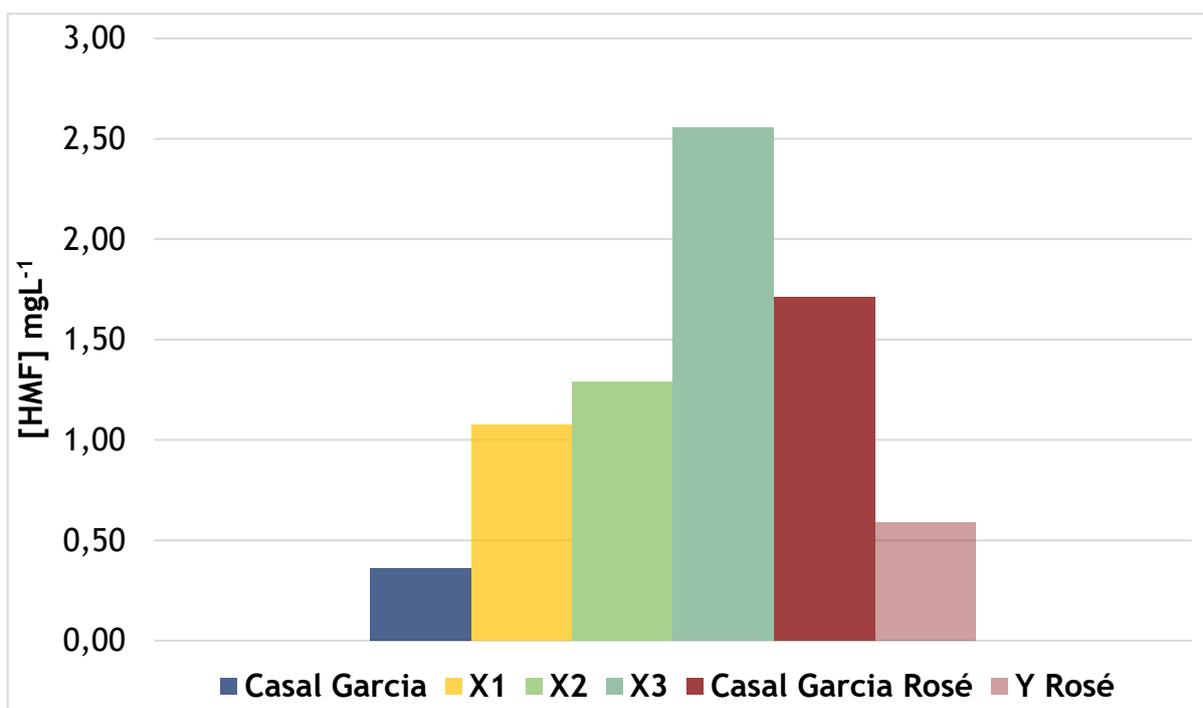


Figura 32- Concentração de HMF (mgL⁻¹), em vinhos do mercado Aveleda e concorrente.

Deduzindo pelo gráfico acima, é de fácil constatação que as marcas de comercialização Aveleda, encontram-se numa posição bastante favorável, uma vez que nos vinhos verdes, o CG Branco é o que apresenta menor [HMF], assim como o CG Rosé na gama dos vinhos verdes Rosés.

Todos os vinhos foram comprados na mesma altura, incluindo os de comercialização Aveleda, sendo sujeitos às mesmas condições posteriormente a isso, no entanto, não há a informação do seu dia de engarrafamento.

4.7 Remoção HMF

Com a finalidade de diminuir as quantidades de HMF dos vinhos da Aveleda, essencialmente os que passam os limiares de perceção determinados, ou seja, os que estão mais expostos a temperaturas mais elevadas e com maior quantidade de açúcares, foram testados vários produtos enológicos para perceber se estes funcionaram na adsorção- moléculas contidas no fluido aderem sobre a superfície de um sólido- da molécula em estudo.

Os produtos enológicos testados são aprovados pela Comissão Europeia para uso em vinhos, nomeadamente, carvão ativado, gel sílica, Polivinilpolipirrolidona (PVPP) e bentonite.

Realizou-se o teste em CG Base, com as quantidades máximas permitidas por lei (Europeia 2009) para cada um dos produtos mencionados acima, 1 g/L - carvão ativado; 0,8 g/L - PVPP; gel sílica e bentonite - 1 g/L, e para metade das quantidades máximas, sendo que os resultados obtidos, ao final de 5 dias podem ser observados na tabela abaixo (tabela 13).

Tabela 13- Percentagens das quantidades de HMF removidas com a aplicação dos produtos enológicos, para a quantidade máxima permitida por lei e metade da mesma.

	CARVÃO ATIVADO (%)	PVPP (%)	GEL SÍLICA (%)	BENTONITE (%)
Quantidade máxima	53	-	2,3	6,6
Metade quantidade máxima	8,5	-	0,51	-

Repare-se que o PVPP e o gel sílica praticamente não removem o composto, a bentonite apenas alcança uma remoção de 7%, sendo o carvão ativado o único produto com sucesso na remoção de HMF.

Assim, com a quantidade máxima, aplica-se o carvão ativado em CG Base e fazem-se medições diárias da [HMF]. Neste sentido, o objetivo será perceber o tempo que o carvão ativado demora até adsorver o composto, figura 33.

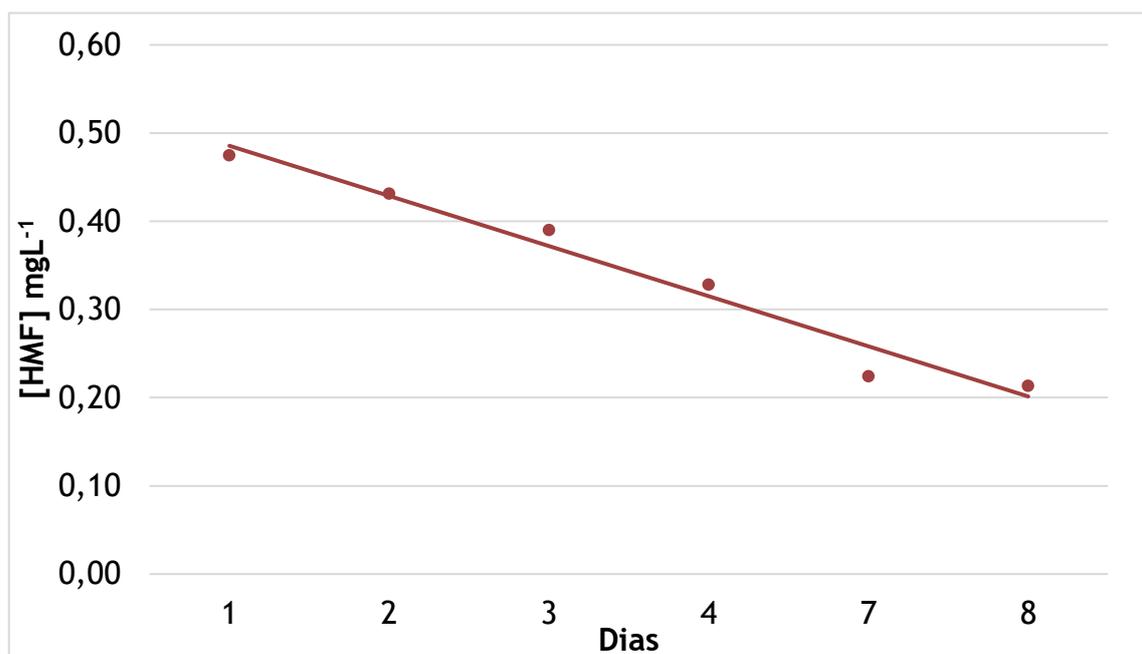


Figura 33- Concentração de HMF (mgL^{-1}), no vinho CG Base com adição da quantidade máxima permitida de carvão ativado, ao longo dos dias.

Pela observação da figura 33, verifica-se que a remoção da molécula não é instantânea, mas sim contínua ao longo dos quatro primeiros dias. O fenómeno que ocorreu acima é descrito como adsorção. Quando o carvão ativado entra em contacto o vinho há uma diminuição da concentração de HMF, existindo um aumento correspondente sobre a superfície do carvão ativado, até se obter uma condição de equilíbrio.

O carvão ativado foi o SAstab®CARBO HP, caracterizado pela sua elevada área superficial específica (S_{BET}) de $1679 \text{ m}^2/\text{g}$ (Ghouma, Jeguirim et al. 2015), sendo bastante eficaz em vinhos. O tempo de contacto foram 8 dias no total, no entanto é a partir do sétimo dia que a adsorção se considera estar em equilíbrio, com uma remoção total de 55 %.

5 Conclusões

Com a realização deste projeto foi possível alcançar o principal objetivo proposto, o estudo da evolução da concentração do hidroximetilfurfural, assim como todos os fatores que pudessem ter impacto na mesma, acompanhando todos os ensaios por análise química, HPLC.

Inicialmente, começou-se por estudar o fator que poderia ter maior influência, a concentração de açúcares, uma vez que o composto é formado a partir destes. Paralelamente a este fator, as condições de armazenamento, temperatura a 20 e 40 °C, foram também estudadas. Assim, quando a adição de açúcares é elevada, a concentração de HMF aumenta até cerca dos 4,00 mg/L, tendo tendência a aumentar ainda mais (até cerca dos 30 mg/L) caso as condições de armazenamento sejam temperaturas elevadas ($T > 20$ °C).

O mosto concentrado retificado (MCR) e o *Muté*, duas técnicas de edulcoração, foram um outro fator de estudo, visto que a formação da molécula depende sempre da quantidade e dos açúcares presentes nos edulcorantes. Verificou-se então, que o vinho quando edulcorado com MCR, à temperatura ambiente, apresenta uma evolução da molécula bastante mais acentuada, convergindo para concentrações altas, 3,5 mg/L. Quanto à edulcoração com *Muté*, é de se notar que a evolução do HMF é muito mais constante e em gamas de concentrações bastante mais baixas ($[HMF] < 0,50$ mg/L).

Quanto ao processo de dessulfitação, estudaram-se diferentes percentagens de dessulfitação (20, 40 e 60%) e duas temperaturas de dessulfitação (100 e 120 °C) para vinhos 100% dessulfitados, ambos proporcionadores de elevado *stress* térmico ao vinho. As diferenças de concentrações não são muito variáveis, quando comparado com o fator da concentração de açúcares à temperatura ambiente, ainda assim, quanto maior a % de dessulfitado e maior a temperatura de dessulfitação, maior é a variação da concentração, tendo um aumento mais significativo.

Quanto às diferentes técnicas de produção, este foi um fator a considerar, uma vez que permitiu utilizar produto acabado já em *stock*. Dos vários vinhos utilizados para o estudo em questão, Casal Garcia, Base e *Sweet*, Quinta da Aveleda e Aveleda Loureiro e Alvarinho, os resultados cruzaram-se com os descritos acima. Quanto maior a concentração de açúcar presente, maior a evolução na concentração do HMF, assim como para condições de armazenamento extremas, esta concentração aumenta para gamas de concentrações superiores.

De forma a perceber se todos estes fatores são válidos a nível estatístico, recorreu-se ao *Design Of Experiments* para avaliar a normalidade, assim como a influência dos fatores em estudo.

Tanto a concentração de açúcares vs condições de armazenamento, como a percentagem de dessulfitado e a temperatura de dessulfitação, confirmaram o pressuposto da normalidade, com todas as variáveis estatisticamente significativas.

Sendo o limiar de percepção do HMF nos vinhos ainda desconhecido, as provas organolépticas realizadas foram promissoras a esse nível. Através de dois testes diferentes, triangular e preferencial, pôde constatar-se que o provador apenas deteta diferenças significativas quando a concentração de HMF está acima dos 10 mg/L, rejeitando esta diferença, tendo preferência pelo vinho com menor concentração de HMF.

No sentido de perceber a posição da Aveleda no mercado, realizou-se um estudo com os concorrentes diretos de vinho branco e rosé. Após análise química, a conclusão foi de que os vinhos comercializados pela Aveleda se encontravam numa posição bastante favorável, sendo os vinhos com menor teor de HMF do estudo.

Por último, com o intuito de elevar os padrões de qualidade, testaram-se vários produtos enológicos aprovados para vinhos, tais como o carvão ativado, bentonite, PVPP e gel sílica, com o propósito da remoção da molécula, ou parte dela. Através de testes, concluiu-se que o carvão ativado seria o produto mais indicado e, com um tempo total de contacto de 8 dias, no entanto é a partir do sétimo dia que a adsorção se considera estar em equilíbrio, obtém-se uma remoção total de 55 %.

Conclui-se desta forma que, o HMF estava presente em todos os vinhos estudados, no entanto apenas foi percebido pelo consumidor, quando os vinhos têm elevadas concentrações de açúcar (acima dos 10 g/L) e estão sujeitos a condições de armazenamento extremas ($T > 20^{\circ}\text{C}$).

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Os principais objetivos do estudo, focaram-se no estudo do HMF nos vinhos brancos e rosés e o impacto na sua qualidade organolética, estudar também diferentes técnicas de produção, qual o impacto da dessulfitação na formação da molécula e, por último ainda o impacto da concentração de açúcares, temperatura de armazenamento e técnicas de edulcoração.

Todos os objetivos propostos foram conseguidos, uma vez que se estudou todos os fatores mencionados acima, fazendo análise contínua ao longo do tempo, percebendo a evolução da molécula.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Para além dos objetivos propostos, ainda se testaram diversos produtos enológicos, como o carvão ativado, PVPP; bentonite e gel sílica com o intuito da remoção/diminuição da quantidade de HMF presente, um pequeno estudo acerca do mercado envolvente e vários testes para tentar encontrar o limiar de perceção do composto em vinhos, visto ser uma incógnita.

Para os resultados obtidos terem fundamento quanto à sua linearidade, ainda se recorreu à análise estatística de planeamento de experiências, *Design Of Experiments* (DOE).

Com o propósito de implementar o método espectrofotométrico de análise de HMF na Aveleda, realizou-se um teste com a criação de uma reta de calibração para posterior medição. No entanto, como a gama de concentrações começava num patamar bastante baixo, apenas foram conseguidos 5 pontos para a mesma e não foi efetuada uma repetição. Por limitação em termos de tempo e reagentes para se realizarem novos ensaios, optou-se por não se colocarem os resultados no corpo principal do trabalho, contudo, encontra-se no Anexo.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

A falta de equipamento na empresa para a realização do trabalho foi a maior limitação do trabalho. Assim, foi necessário conseguir um laboratório externo que realizasse as análises, no entanto houve sempre a necessidade de esperar pela disponibilidade do mesmo para que estas se realizassem.

Sendo a Aveleda S.A, uma indústria que está constantemente em produção, o facto de estudar o processo de dessulfitação foi uma tarefa complicada, uma vez que foi necessária uma grande

gestão por parte das produções e dos trabalhadores para que se pudesse despende de tanques de armazenamento.

Todos os trabalhos que envolvem investigação, devido ao elevado grau de desconhecido, o fator limitante é o tempo, uma vez que houve a necessidade da constante adaptação dos objetivos, mediante os resultados encontrados.

Neste sentido, propõe-se como possibilidade para trabalho futuro, o estudo da edulcoração em diferentes vinhos, como as sangrias, uma vez que são um dos produtos em que mais se utiliza a técnica. O estudo mais aprofundado da remoção da molécula, com outros produtos enológicos, ou então a repetição dos resultados obtidos para o carvão ativado, testando outros fatores é uma outra possibilidade para trabalho futuro.

Por último, a realização de mais provas sensoriais, com diferentes leques de provadores, com diferentes provas, de modo a perceber se o consumidor aceita ou não a molécula e até que gama de concentrações.

6.4 Apreciação Final

Apesar dos contratempos normais de um trabalho inovador, o facto da realização do projeto ter sido realizada em indústria permitiu uma visão muito mais alargada, daquilo que é o mundo da indústria.

Proporcionou o conhecimento da gestão de uma equipa de trabalho diária com controlo horário de produção, compreensão da organização que é realizada para que as produções sejam realizadas de acordo com aquilo que o fornecedor pede, conhecimento de novas técnicas de produção de vinho e, acima de tudo o enriquecimento pessoal que é trabalhar na indústria, toda a responsabilidade, dinâmica e desenrasque que permite obter.

Referências

A.S. Curvelo-Garcia, P. B. (2015). Química Enológica-Métodos Analíticos. Porto, Portugal, Agrobook.

Abraham, K., R. Gurtler, K. Berg, G. Heinemeyer, A. Lampen and K. E. Appel (2011). "Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food." Mol Nutr Food Res **55**(5): 667-678.

Antonelli, A., F. Chinnici and F. Masino (2004). "Heat-induced chemical modification of grape must as related to its concentration during the production of traditional balsamic vinegar: a preliminary approach." Food Chemistry **88**(1): 63-68.

APCER. (2018). Acedido a 10/04/2018, em <https://www.apcergroup.com/portugal/index.php/pt/artigos/284/testemunho-a-certificacao-na-aveleda>.

Aveleda.a). (2018). Acedido a 23/03/2018, em <https://www.aveleda.com/pt/empresa/historia/aveleda>.

Aveleda.b). (2018). Acedido a 23/03/2018, em <https://www.aveleda.com/pt/empresa/portfolio>.

Canasa, S., A. P. Belchiora, M. I. Spranger and R. Bruno-de-Sousab (2003). "High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation." Journal of Separation Science **26**: 496-502.

Capuano, E. and V. Fogliano (2011). "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies." LWT - Food Science and Technology **44**(4): 793-810.

Consult, E. (2018). "The use of Sulphur Dioxide." Acedido a 20/02/2018, em <http://www.uwe-hofmann.org/The%20use%20of%20Sulphur%20Dioxide.pdf>.

Diez, A. M., A. S. Ribeiro, M. A. Sanroman and M. Pazos (2018). "Optimization of photo-Fenton process for the treatment of prednisolone." Environ Sci Pollut Res Int.

Erik R. Christensen, A. L. (2014). Physical and Chemical Processes in the Aquatic Environment, John Willey & Sons.

- Europeia, J. O. d. U. (2008). Regulamento. 479/2008, IVV.
- Europeia, J. O. d. U. (2009). Regulamento. 606/2009, IVV.
- Europeias, J. O. d. C. (1999). Regulamento. 1493/99, IVV.
- Ferreira, V. (2010). "Volatile aroma compounds and wine sensory attributes." 3-28.
- Florian, S., M. Bauer-Marinovic, F. Taugner, G. Dobbernack, B. H. Monien, W. Meinl and H. Glatt (2012). "Study of 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulfooxymethylfurfural on induction of colonic aberrant crypt foci in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2." Mol Nutr Food Res **56**(4): 593-600.
- Ghouma, I., M. Jeguirim, S. Dorge, L. Limousy, C. Matei Ghimbeu and A. Ouederni (2015). "Activated carbon prepared by physical activation of olive stones for the removal of NO₂ at ambient temperature." Comptes Rendus Chimie **18**(1): 63-74.
- Hasdell, R. P. C. D. H. L. T. A. (2000). Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control, Aspen.
- Husoy, T., M. Haugen, M. Murkovic, D. Jobstl, L. H. Stolen, T. Bjellaas, C. Ronningborg, H. Glatt and J. Alexander (2008). "Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure." Food and Chemical Toxicology **46**(12): 3697-3702.
- IVDP.b). Acedido a 26/02/2018, em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0607&from=PT>.
- Jackson, R. S. (2008). Wine Science – Principles and Applications., Academic Press.
- Kenneth C. Fugelsang, C. G. E. (2007). <Wine Microbiology-Practical Applications And Procedures>. New York, USA, Springer.
- Kowalski, S., M. Lukasiewicz, A. Duda-Chodak and G. Zięć (2013). "5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) - Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation - a Review." Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **63**(4): 207-225.
- Martins, S. J., W; Van Boekel. M (2001). "A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling." Food Science & Technology **11**: 364-373.
- McGovern, P., M. Jalabadze, S. Batiuk, M. P. Callahan, K. E. Smith, G. R. Hall, E. Kvavadze, D. Maghradze, N. Rusishvili, L. Bouby, O. Failla, G. Cola, L. Mariani, E. Boaretto, R. Bacilieri, P. This, N. Wales and D. Lordkipanidze (2017). "Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(48): E10309-E10318.

OIV.a) (2011). Method OIV-MA-F1-02, OIV.a.

Oliveira e Silva, H., P. G. de Pinho, B. P. Machado, T. Hogg, J. C. Marques, J. S. Camara, F. Albuquerque and A. C. Ferreira (2008). "Impact of forced-aging process on madeira wine flavor." J Agric Food Chem **56**(24): 11989-11996.

PubChem. "

" Acedido a 17/01/2018, em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-hydroxymethylfurfural#section=Names-and-Identifiers>.

Roessler, M. A. A. R. M. P. E. B. (1965). Principles of Sensory Evaluation of Food. Food Science and Technology. A. Press. New York, Academic Press: 1-22.

Roman-Leshkov, Y., J. N. Chheda and J. A. Dumesic (2006). "Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose." Science **312**(5782): 1933-1937.

Rushing, H., A. Karl and J. Wisnowski (2013). Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery. North Carolina, USA, SAS.

Sampath, G. and S. Kannan (2013). "Fructose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural: Remarkable solvent influence on recyclability of Amberlyst-15 catalyst and regeneration studies." Catalysis Communications **37**: 41-44.

Saravanan, K., K. S. Park, S. Jeon and J. W. Bae (2018). "Aqueous Phase Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from Glucose over Large Pore Mesoporous Zirconium Phosphates: Effect of Calcination Temperature." ACS Omega **3**(1): 808-820.

Shoemaker, T. R. B. L. D. J. M. A. W. (2017). Conversion of fructose-containing feedstocks to HMF-containing product, Rennovia Inc., Santa Clara, CA (US)

Sidel, H. S. J. (1993). Sensory Evaluation Practices. S. Taylor, Academic Press.

Skoog, West, Holler and Crouch (2006). Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana.

Smith, N. H. (1964). Preparation of hydroxymethylfurfural. **3118912**.

Standardization, I. O. f. (2004). Sensory analysis – Methodology –Triangle test. ISO 4120. Switzerland.

Strassburger. Acedido a 26/02/2018, em <http://www.strassburger-filter.de/en/products/desulphurisation-systems/>.

Wines.com. Acedido a 28/08/2018, em <http://www.wines.com/wiki/mute/>.

Xuetong, F., H. Lihan and K. J. B. Sokorai (2008). "Factors Affecting Thermally Induced Furan Formation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 9490-9494.

Anexo A Dessulfitor

O dessulfitor utilizado na Aveleda é da Strassburguer, modelo KOL 10000 - 2ND 500. Tem capacidade para dessulfitar até cerca de 10 000 L/h, no entanto raramente se atinge este patamar devido aos elevados níveis de sulfuroso. O equipamento tem um consumo elétrico de 15 kW, consome cerca de 600 kg/h de vapor e quanto ao seu consumo energético é de aproximadamente 300 kg/h.

Na figura abaixo é possível ver a esquematização do dessulfitor.

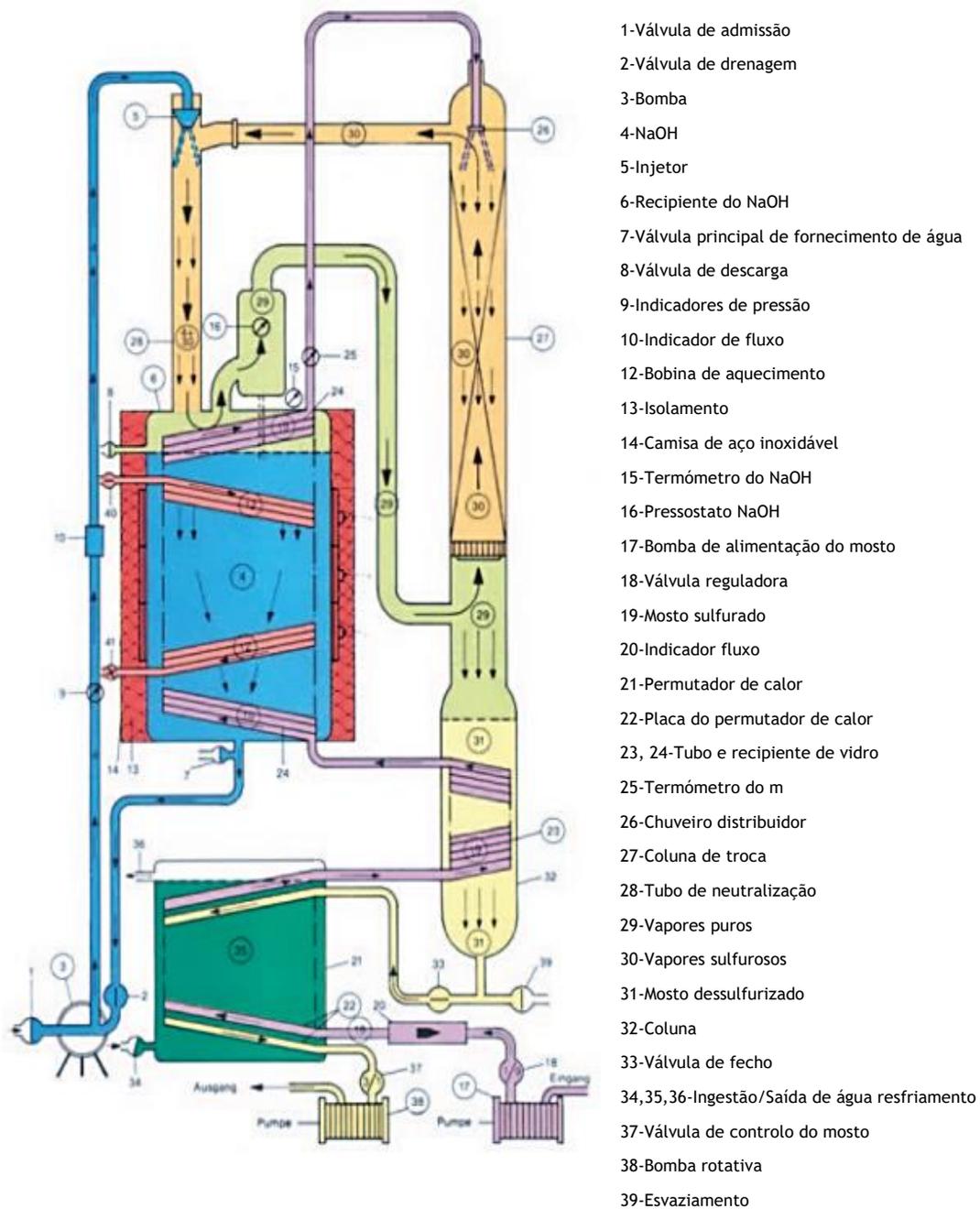


Figura A1-Esquemática do Dessulfitor Strassburguer.

Anexo B Determinação dos Teores de Anidrido Sulfuroso Livre e Total

De modo a controlar a qualidade do mosto dessulfitado, são necessárias análises de hora a hora à quantidade de sulfuroso total, segundo o seguinte procedimento.

B.1 Determinação pelo Método de Ripper

B.1.1 Determinação do anidrido sulfuroso livre

- De uma garrafa por encetar retirar, com uma pipeta, 25mL de vinho para um balão *Erlenmeyer*;
- Juntar 3 mL de ácido sulfúrico 25% e cerca de 2mL de cozimento de amido;
- Titular de imediato com iodo 0,02 M até que a coloração azul, a princípio fugaz, persista durante 10 a 15 segundos (V_1).

B.1.2 Determinação do anidrido sulfuroso total

- Adicionar 10 mL de hidróxido de potássio 1 M a um balão *Erlenmeyer*;
- Pipetar 25 mL de vinho para o mesmo balão;
- Misturar levemente, sem agitar, rolar e aguardar 10 minutos para que possa existir cominação;
- Adicionar 6mL de ácido sulfúrico 25% e 2mL de cozimento de amido;
- Titular de imediato com iodo 0,02 M até que a coloração azul, a princípio fugaz, persista durante 10 a 15 segundos (V_2).

B.1.3 Substâncias Interferentes

Visto que, certas substâncias são oxidadas pelo iodo em meio ácido, é fundamental avaliar a quantidade de iodo consumido nessas oxidações. Para isso, é necessário combinar o anidrido sulfuroso livre com um excesso de etanal, antes da titulação.

- Adicionar a um balão *Erlenmeyer* 25mL de vinho e 3 mL da solução de etanal 7 g/L;
- Rolhar e aguardar cerca de 30 minutos e de seguida, titular pelo mesmo procedimento do anidrido sulfuroso livre (V_3).

Ou:

- *Método Prático*: Adicionar 25mL de vinho e 2 gotas de água oxigenada. Agitar e, seguidamente, titular pelo mesmo procedimento do anidrido sulfuroso livre (V_3).

B.1.4 Resultados

Sendo:

V₁- volume (mL) de iodo 0,02M, gasto na titulação do anidrido sulfuroso livre;

V₂- volume (mL) de iodo 0,02M, gasto na titulação do anidrido sulfuroso total;

V₃- volume (mL) de iodo 0,02M, gasto na titulação das substâncias oxidáveis pelo iodo em meio ácido.

Anidrido Sulfuroso Livre

$$SO_2 \text{ livre } \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(V_1 - V_3) \times 0,02 \times 32}{25}$$

Anidrido Sulfuroso Total

$$SO_2 \text{ livre } \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(V_2 - V_3) \times 0,02 \times 32}{25}$$

B.2 Determinação com Titulador Automático

B.2.1 Determinação do anidrido sulfuroso livre

- De uma garrafa por encetar retirar, com uma pipeta, 10mL de vinho para um tubo de análise;
- Adicionar cerca de 1g de iodeto de potássio e introduzir uma barra magnética no tubo de análise;
- Colocar o tubo no agitador do equipamento e introduzir o eletrodo na amostra;
- Utilizando as teclas de navegação do equipamento, selecionar no mostrador a opção “Analisar SO2 livre” e carregar em “OK”;
- O equipamento devolve o teor de anidrido sulfuroso livre em mg/L;
- Lavar o eletrodo com água desionizada no fim de cada determinação.

B.2.2 Determinação do anidrido sulfuroso total

- De uma garrafa, pode ser a mesma que foi usada na determinação do anidrido sulfuroso livre, retirar, com uma pipeta, 10mL de vinho para um tubo de análise;
- Adicionar cerca de 1g de iodeto de potássio e introduzir uma barra magnética no tubo de análise;
- Colocar o tubo no agitador do equipamento e introduzir o eletrodo na amostra;
- Utilizando as teclas de navegação do equipamento, selecionar no mostrador a opção “Analisar SO2 total” e carregar em “OK”;
- O equipamento devolve o teor de anidrido sulfuroso livre em mg/L;
- Lavar o eletrodo com água desionizada no fim de cada determinação.

Anexo C Exemplos de Cálculo

C.1 Concentração de açúcares

Através da equação 4 mostrada no texto principal, é calculado o volume de MCR/Muté que tem de se adicionar para obter a concentração de açúcares pretendida.

- Para $C_f=10$ g/L, numa garrafa de 750 mL, o exemplo de cálculo apresenta-se abaixo:

$$[C_{açúcar f}] = \frac{V_{garrafa}[C_{açúcar i}] + V_{MCR}[C_{açúcar MCR}]}{V_{final}} \quad \text{Equação C.1.1}$$

$$\Leftrightarrow 10 = \frac{0,745 \times 4,72 + V_{MCR} \times 0,850}{0,750}$$

$$\Leftrightarrow V_{MCR} = 4,7 \text{ mL}$$

C.2 Desvios Padrão

Para todas as amostras foi calculado o desvio padrão associado, através da função do excel “DESVPAD.S”, que apresenta como fórmula:

$$\text{Desvio Padrão amostra} = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Equação C.2.1}$$

Em que x é a média da amostra e n , o tamanho da amostra.

C.3 Volume a adicionar de HMF

Para as provas sensoriais realizadas, foi necessário adicionar aos vinhos levados a prova, solução de HMF, de modo a que se obtivessem concentrações superiores às concentrações base que estes possuíam. Inicialmente preparou-se a concentração mãe de HMF 200 mg/L e a partir desta realizaram-se os seguintes cálculos.

- Para a concentração de HMF de 0,092 mg/L, calculam-se as massas correspondentes a esta concentração já existente e à concentração pretendida.

-Cálculo da massa da concentração presente no QA

$$C = \frac{m}{v}$$

$$\Leftrightarrow 0,092 = \frac{m}{0,750}$$

$$\Leftrightarrow m = 0,069 \text{ mg}$$

-Cálculo da massa para 1 mg/L de concentração

$$1 = \frac{m}{0,750}$$

$$\Leftrightarrow m = 0,750 \text{ mg}$$

Subtraindo uma à outra, obtém-se a massa para se calcular a concentração necessária:

$$m_{\text{pretendido}} - m_{\text{inicial}} = 0,750 - 0,069 = 0,681 \text{ mg}$$

$$C = \frac{0,681}{0,750}$$

$$\Leftrightarrow C = 0,908 \text{ mg/L}$$

Posteriormente é necessário calcular o volume correspondente à concentração de 1 mg/L no vinho QA:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$\Leftrightarrow 200 \times V_i = 1 \times 0,750$$

$$\Leftrightarrow V_i = 3,75 \text{ mL}$$

Por último apenas é necessário correlacionar a concentração de 1 mg/L com o volume acima:

$$\frac{1 \text{ mg}}{\text{L}} - 3,75 \text{ mL}$$

$$0,908 - X \text{ mL}$$

$$\Leftrightarrow X = 3,41 \text{ mL}$$

Assim, sabe-se que para se obter a concentração final de 1 mg/L, teria de se adicionar 3,41 ml da solução mãe de HMF de 200 mg/L.

C.4 Resultados provas triangulares

Através da ISO 4120:2004 analisaram-se os resultados para a prova triangular, sendo que todos os cálculos se encontram abaixo.

Para o caso, de 23 provadores, em que 11 acertaram:

- Proporção que acertou

$$p_c = \frac{x}{n} \quad \text{Equação C. 4. 1}$$

Em que:

x - Número de respostas corretas

n - Número total de provadores

$$\Leftrightarrow p_c = \frac{11}{23} = 0,48$$

- Proporção distinguida

$$p_d = 1,5 \times p_c - 0,5 \quad \text{Equação C. 4. 2}$$

$$\Leftrightarrow p_d = 1,5 \times 0,48 - 0,5$$

$$\Leftrightarrow p_d = 0,22$$

- Desvio padrão da proporção distinguida

$$\sigma_d = 1,5 \times \sqrt{p_c \times \frac{1 - p_c}{n}} \quad \text{Equação C. 4. 3}$$

$$\Leftrightarrow \sigma_d = 1,5 \times \sqrt{0,48 \times \frac{1 - 0,22}{23}}$$

$$\Leftrightarrow \sigma_d = 0,16$$

- Limite de confiança superior

$$LC_s = p_d + (z_\alpha \times \sigma_d) \quad \text{Equação C. 4. 4}$$

$$\Leftrightarrow LC_s = 0,22 + (0,8416 \times 0,16)$$

$$\Leftrightarrow LC_s = 0,35$$

Em que:

z_α - valor crítico da distribuição normal padrão, para um nível de confiança de 80%, 0,8416

- Limite de confiança inferior

$$LC_i = p_d - (z_\alpha \times \sigma_d) \text{ Equação C.4.5}$$

$$\Leftrightarrow LC_i = 0,22 - (0,8416 \times 0,16)$$

$$\Leftrightarrow LC_i = 0,086$$

Anexo D Tabelas de Resultados

D.1 Concentração de açúcares vs condições de armazenamento

Foram efetuadas análises a cada duas semanas. Assim, t_0 corresponde ao momento de armazenamento, $t_1=2$ semanas após t_0 e assim, sucessivamente para os restantes. Na tabela abaixo são então apresentados os resultados sob a forma de tabela relativos aos fatores estudados acima, concentração de açúcares vs condições de armazenamento, com o respetivo desvio padrão associado.

Tabela D1- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, com diferentes concentrações de açúcares (gL^{-1}), a diferentes temperaturas de armazenamento, $^{\circ}\text{C}$, ao longo do tempo.

Caçúcares / gL^{-1}	$T_{\text{armazenamento}} / ^{\circ}\text{C}$	[HMF] $\pm \sigma$ / mgL^{-1}				
		t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
1,5	20	$0,112 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$0,231 \pm 3,53 \times 10^{-3}$	$0,305 \pm 4,95 \times 10^{-3}$	$0,433 \pm 1,20 \times 10^{-2}$	$0,469 \pm 7,78 \times 10^{-3}$
	40	-	$1,15 \pm 4,95 \times 10^{-3}$	$1,93 \pm 1,56 \times 10^{-2}$	$2,06 \pm 6,36 \times 10^{-3}$	$2,42 \pm 4,24 \times 10^{-3}$
10	20	$0,172 \pm 5,66 \times 10^{-3}$	$0,313 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$0,374 \pm 2,12 \times 10^{-3}$	$0,479 \pm 3,54 \times 10^{-3}$	$0,499 \pm 1,06 \times 10^{-2}$
	40	-	$1,16 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$1,31 \pm 4,95 \times 10^{-3}$	$2,26 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$2,53 \pm 7,07 \times 10^{-4}$
20	20	$0,673 \pm 6,37 \times 10^{-3}$	$0,855 \pm 7,78 \times 10^{-3}$	$1,08 \pm 2,83 \times 10^{-3}$	$1,39 \pm 5,66 \times 10^{-3}$	$1,41 \pm 4,24 \times 10^{-3}$
	40	-	$3,30 \pm 3,53 \times 10^{-3}$	$5,72 \pm 4,24 \times 10^{-3}$	$7,19 \pm 1,34 \times 10^{-2}$	$8,53 \pm 2,83 \times 10^{-3}$
40	20	$1,51 \pm 8,49 \times 10^{-3}$	$1,77 \pm 2,82 \times 10^{-3}$	$1,97 \pm 6,36 \times 10^{-3}$	$2,35 \pm 7,78 \times 10^{-3}$	$2,47 \pm 3,11 \times 10^{-2}$
	40	-	$5,61 \pm 1,20 \times 10^{-2}$	$10,4 \pm 3,39 \times 10^{-2}$	$13,6 \pm 2,13 \times 10^{-3}$	$16,9 \pm 10,6 \times 10^{-2}$
60	20	$1,73 \pm 4,45 \times 10^{-2}$	$2,89 \pm 9,19 \times 10^{-3}$	$3,42 \pm 9,90 \times 10^{-3}$	$3,76 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$4,03 \pm 7,07 \times 10^{-3}$
	40	-	$8,82 \pm 3,54 \times 10^{-2}$	$16,5 \pm 7,32 \times 10^{-1}$	$20,8 \pm 8,98 \times 10^{-2}$	$27,1 \pm 3,04 \times 10^{-2}$

D.2 Técnicas de edulcoração

Tabela D2- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para os vinhos QA, sujeitos a diferentes técnicas de edulcoração, MCR e *Muté*, ao longo do tempo.

Caçúcares $/\text{gL}^{-1}$	Tipo de edulcoração	[HMF] $\pm \sigma / \text{mgL}^{-1}$		
		t ₁	t ₂	t ₃
10	MCR	$0,172 \pm 5,66 \times 10^{-3}$	$0,313 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$0,374 \pm 2,12 \times 10^{-3}$
	<i>Muté</i>	$0,326 \pm 1,27 \times 10^{-2}$	$0,276 \pm 1,49 \times 10^{-3}$	$0,425 \pm 7,07 \times 10^{-4}$
20	MCR	$0,673 \pm 6,37 \times 10^{-3}$	$0,855 \pm 7,78 \times 10^{-3}$	$1,08 \pm 2,83 \times 10^{-3}$
	<i>Muté</i>	$0,389 \pm 1,06 \times 10^{-2}$	$0,427 \pm 5,66 \times 10^{-3}$	$0,431 \pm 5,66 \times 10^{-3}$
40	MCR	$1,51 \pm 8,49 \times 10^{-3}$	$1,77 \pm 2,82 \times 10^{-3}$	$1,97 \pm 6,36 \times 10^{-3}$
	<i>Muté</i>	$0,40 \pm 9,90 \times 10^{-3}$	$0,407 \pm 3,32 \times 10^{-3}$	$0,451 \pm 4,38 \times 10^{-3}$
60	MCR	$1,73 \pm 4,45 \times 10^{-2}$	$2,89 \pm 9,19 \times 10^{-3}$	$3,42 \pm 9,90 \times 10^{-3}$
	<i>Muté</i>	$0,384 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$0,436 \pm 7,78 \times 10^{-3}$	$0,483 \pm 5,80 \times 10^{-3}$

D.3 Percentagem de dessulfitação

Tabela D3- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), em vinho SPL, sujeitos a diferentes % de dessulfitação, 20; 40 e 60, ao longo do tempo.

%	[HMF] $\pm \sigma$ / mgL^{-1}					
	Dessulfitação	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
20	<LD		$0,225 \pm 7,07 \times 10^{-3}$	$0,349 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$0,558 \pm 4,24 \times 10^{-3}$	$0,731 \pm 7,07 \times 10^{-4}$
40	<LD		$0,515 \pm 7,07 \times 10^{-3}$	$0,665 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$1,05 \pm 2,83 \times 10^{-3}$	$1,28 \pm 4,24 \times 10^{-3}$
60		$0,450 \pm 1,41 \times 10^{-2}$	$0,665 \pm 2,12 \times 10^{-2}$	$0,759 \pm 1,77 \times 10^{-2}$	$1,21 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$1,56 \pm 2,83 \times 10^{-3}$

D.4 Temperatura de dessulfitação

Tabela D4- Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), em vinho SPL, sujeitos a diferentes Temperaturas de dessulfitação, 100 e 120 °C, ao longo do tempo.

Temperatura Dessulfitação / °C	[HMF] $\pm \sigma$ / mgL^{-1}		
	t ₁	t ₂	t ₃
100	$0,434 \pm 7,07 \times 10^{-4}$	$0,523 \pm 4,95 \times 10^{-3}$	$0,739 \pm 7,78 \times 10^{-3}$
120	$0,748 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$0,896 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	$1,08 \pm 2,26 \times 10^{-2}$

D.5 Técnicas de produção

Casal Garcia

Tabela D5- Resultados da concentração de HMF(mgL^{-1}), para Casal Garcia produto acabado, sujeitos a diferentes temperaturas de armazenamento 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

	$T_{\text{armazenamento}} / ^\circ\text{C}$	$[\text{HMF}] \pm \sigma / \text{mgL}^{-1}$			
		t_1	t_2	t_3	t_4
CG BASE	20	$0,359 \pm 1,27 \times 10^{-2}$	$0,513 \pm 2,83 \times 10^{-3}$	$0,733 \pm 6,36 \times 10^{-3}$	$0,733 \pm 6,36 \times 10^{-3}$
	40		$1,56 \pm 3,54 \times 10^{-3}$	$3,13 \pm 4,23 \times 10^{-3}$	$3,86 \pm 4,17 \times 10^{-2}$
CG SWEET 40 G/L	20	$0,817 \pm 1,05 \times 10^{-3}$	$1,06 \pm 7,07 \times 10^{-3}$	$1,21 \pm 1,20 \times 10^{-2}$	$1,37 \pm 2,19 \times 10^{-2}$
	40		$3,96 \pm 2,12 \times 10^{-3}$	$8,14 \pm 4,98 \times 10^{-4}$	$11,9 \pm 5,02 \times 10^{-2}$
CG SWEET 60 G/L	20	$1,92 \pm 2,93 \times 10^{-2}$	$2,11 \pm 2,12 \times 10^{-2}$	$2,30 \pm 8,45 \times 10^{-4}$	$2,80 \pm 7,57 \times 10^{-3}$
	40		$5,09 \pm 1,13 \times 10^{-2}$	$11,4 \pm 3,25 \times 10^{-2}$	$13,6 \pm 4,28 \times 10^{-2}$

Aveleda**Tabela D6-** Resultados da concentração de HMF (mgL^{-1}), para Casal Garcia produto acabado, sujeitos a diferentes temperaturas de armazenamento 20 e 40 °C, ao longo do tempo.

	$T_{\text{armazenamento}} / ^\circ\text{C}$	$[\text{HMF}] \pm \sigma / \text{mgL}^{-1}$			
		t_1	t_2	t_3	t_4
QA	20		$0,207 \pm 4,24 \times 10^{-3}$	$0,277 \pm 1,07 \times 10^{-3}$	$0,390 \pm 6,29 \times 10^{-3}$
	40	$0,092 \pm 2,10 \times 10^{-3}$	$0,743 \pm 2,83 \times 10^{-3}$	$1,36 \pm 1,04 \times 10^{-2}$	$1,76 \pm 4,24 \times 10^{-4}$
Loureiro 4 g/L	20		$0,227 \pm 1,13 \times 10^{-2}$	$0,258 \pm 1,80 \times 10^{-3}$	$0,321 \pm 3,54 \times 10^{-3}$
	40	$0,092 \pm 1,37 \times 10^{-3}$	$0,610 \pm 3,54 \times 10^{-3}$	$1,25 \pm 1,08 \times 10^{-2}$	$2,13 \pm 1,69 \times 10^{-2}$
Loureiro 8 g/L	20		$0,367 \pm 2,12 \times 10^{-3}$	$0,414 \pm 9,49 \times 10^{-3}$	$0,511 \pm 1,21 \times 10^{-2}$
	40	$0,233 \pm 3,22 \times 10^{-3}$	$1,54 \pm 2,12 \times 10^{-3}$	$3,40 \pm 1,36 \times 10^{-2}$	$3,78 \pm 3,54 \times 10^{-4}$
Alvarinho	20	$0,180 \pm 4,65 \times 10^{-3}$	$0,386 \pm 7,67 \times 10^{-3}$	$0,517 \pm 3,82 \times 10^{-3}$	-

Anexo E Fichas de Prova

E.1 Prova triangular

	FICHA DE PROVA
	TESTE TRIANGULAR

ENSAIO: _____ **DATA:** _____

PROVADOR: _____

Identifique a amostra que considera diferente das restantes.

Identificação do Teste:

Amostra			
Assinale com X a Diferente			
Comentários/Observações:			

Identificação do Teste:

Amostra			
Assinale com X a Diferente			
Comentários/Observações:			

Identificação do Teste:

Amostra			
Assinale com X a Diferente			
Comentários/Observações:			

E.2 Prova preferencial

	FICHA DE PROVA		
	TESTE PREFERENCIAL		

ENSAIO: _____ **DATA:** _____

PROVADOR: _____

Ordene de acordo com a sua preferência.

Identificação do Teste:

Amostra			
Ordene de forma preferencial			
Comentários/Observações:			

Identificação do Teste:

Amostra			
Ordene de forma preferencial			
Comentários/Observações:			

Anexo F Tabelas de probabilidades ISO 4120:2004

α	P_d	β				
		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
0,20	50 %	7	12	16	25	36
0,10		12	15	20	30	43
0,05		18	20	23	35	48
0,01		25	30	35	47	62
0,001		36	43	48	62	81
0,20	40 %	12	17	25	36	55
0,10		17	25	30	46	67
0,05		23	30	40	57	79
0,01		35	47	56	76	102
0,001		55	68	76	102	130
0,20	30 %	20	28	39	64	97
0,10		30	43	54	81	119
0,05		40	53	66	98	136
0,01		62	82	97	131	181
0,001		93	120	138	181	233
0,20	20 %	39	64	86	140	212
0,10		62	89	119	178	280
0,05		87	117	147	213	305
0,01		136	176	211	292	397
0,001		207	257	302	396	513
0,20	10 %	149	238	325	529	819
0,10		240	348	457	683	1 011
0,05		325	447	572	828	1 181
0,01		525	680	824	1 132	1 539
0,001		803	996	1 165	1 530	1 992

Figura F1-Número de provadores necessários para o teste triangular.

n	α					n	α				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
6	4	5	5	6	—	27	12	13	14	16	18
7	4	5	5	6	7	28	12	14	15	16	18
8	5	5	6	7	8	29	13	14	15	17	19
9	5	6	6	7	8	30	13	14	15	17	19
10	6	6	7	8	9						
						31	14	15	16	18	20
11	6	7	7	8	10	32	14	15	16	18	20
12	6	7	8	9	10	33	14	15	17	18	21
13	7	8	8	9	11	34	15	16	17	19	21
14	7	8	9	10	11	35	15	16	17	19	22
15	8	8	9	10	12						
						36	15	17	18	20	22
16	8	9	9	11	12	42	18	19	20	22	25
17	8	9	10	11	13	48	20	21	22	25	27
18	9	10	10	12	13	54	22	23	25	27	30
19	9	10	11	12	14	60	24	26	27	30	33
20	9	10	11	13	14	66	26	28	29	32	35
21	10	11	12	13	15	72	28	30	32	34	38
22	10	11	12	14	15	78	30	32	34	37	40
23	11	12	12	14	16	84	33	35	36	39	43
24	11	12	13	15	16	90	35	37	38	42	45
25	11	12	13	15	17	96	37	39	41	44	48
26	12	13	14	15	17	102	39	41	43	46	50

NOTE 1 Values in the table are exact because they are based on the binomial distribution. For values of n not in the table, compute approximate values for the missing entries based on the normal approximation to the binomial as follows. Minimum number of responses (x) – nearest whole number greater than

$$x = (n/3) + z \sqrt{2n/9}$$

where

z varies with the significance level as follows: 0,84 for α=0,20; 1,28 for α=0,10; 1,64 for α=0,05; 2,33 for α=0,01; 3,09 for α=0,001.

NOTE 2 Values of n < 18 are usually not recommended for a triangle test for a difference.

NOTE 3 Adapted from Reference [11].

Figura F2- Número máximo de respostas corretas, necessários para que duas amostras sejam similares.

Z	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	0.5000	0.5040	0.5080	0.5120	0.5160	0.5199	0.5239	0.5279	0.5319	0.5359
0.1	0.5398	0.5438	0.5478	0.5517	0.5557	0.5596	0.5636	0.5675	0.5714	0.5753
0.2	0.5793	0.5832	0.5871	0.5910	0.5948	0.5987	0.6026	0.6064	0.6103	0.6141
0.3	0.6179	0.6217	0.6255	0.6293	0.6331	0.6368	0.6406	0.6443	0.6480	0.6517
0.4	0.6554	0.6591	0.6628	0.6664	0.6700	0.6736	0.6772	0.6808	0.6844	0.6879
0.5	0.6915	0.6950	0.6985	0.7019	0.7054	0.7088	0.7123	0.7157	0.7190	0.7224
0.6	0.7257	0.7291	0.7324	0.7357	0.7389	0.7422	0.7454	0.7486	0.7517	0.7549
0.7	0.7580	0.7611	0.7642	0.7673	0.7704	0.7734	0.7764	0.7794	0.7823	0.7852
0.8	0.7881	0.7910	0.7939	0.7967	0.7995	0.8023	0.8051	0.8078	0.8106	0.8133
0.9	0.8159	0.8186	0.8212	0.8238	0.8264	0.8289	0.8315	0.8340	0.8365	0.8389
1.0	0.8413	0.8438	0.8461	0.8485	0.8508	0.8531	0.8554	0.8577	0.8599	0.8621
1.1	0.8643	0.8665	0.8686	0.8708	0.8729	0.8749	0.8770	0.8790	0.8810	0.8830
1.2	0.8849	0.8869	0.8888	0.8907	0.8925	0.8944	0.8962	0.8980	0.8997	0.9015
1.3	0.9032	0.9049	0.9066	0.9082	0.9099	0.9115	0.9131	0.9147	0.9162	0.9177
1.4	0.9192	0.9207	0.9222	0.9236	0.9251	0.9265	0.9279	0.9292	0.9306	0.9319
1.5	0.9332	0.9345	0.9357	0.9370	0.9382	0.9394	0.9406	0.9418	0.9429	0.9441
1.6	0.9452	0.9463	0.9474	0.9484	0.9495	0.9505	0.9515	0.9525	0.9535	0.9545
1.7	0.9554	0.9564	0.9573	0.9582	0.9591	0.9599	0.9608	0.9616	0.9625	0.9633
1.8	0.9641	0.9649	0.9656	0.9664	0.9671	0.9678	0.9686	0.9693	0.9699	0.9706
1.9	0.9713	0.9719	0.9726	0.9732	0.9738	0.9744	0.9750	0.9756	0.9761	0.9767
2.0	0.9772	0.9778	0.9783	0.9788	0.9793	0.9798	0.9803	0.9808	0.9812	0.9817
2.1	0.9821	0.9826	0.9830	0.9834	0.9838	0.9842	0.9846	0.9850	0.9854	0.9857
2.2	0.9861	0.9864	0.9868	0.9871	0.9875	0.9878	0.9881	0.9884	0.9887	0.9890
2.3	0.9893	0.9896	0.9898	0.9901	0.9904	0.9906	0.9909	0.9911	0.9913	0.9916
2.4	0.9918	0.9920	0.9922	0.9924	0.9927	0.9929	0.9931	0.9932	0.9934	0.9936
2.5	0.9938	0.9940	0.9941	0.9943	0.9945	0.9946	0.9948	0.9949	0.9951	0.9952
2.6	0.9953	0.9955	0.9956	0.9957	0.9958	0.9960	0.9961	0.9962	0.9963	0.9964
2.7	0.9965	0.9966	0.9967	0.9968	0.9969	0.9970	0.9971	0.9972	0.9973	0.9974
2.8	0.9974	0.9975	0.9976	0.9977	0.9977	0.9978	0.9979	0.9979	0.9980	0.9981
2.9	0.9981	0.9982	0.9982	0.9983	0.9984	0.9984	0.9985	0.9985	0.9986	0.9986

Figura F3- Valores da distribuição normal.

Anexo G Implementação do método espectrofotométrico

De modo a tentar implementar o método de espectrofotometria na Aveleda, através de alguns ajustes do método do OIV , decidiu-se criar uma gama de concentrações entre os valores encontrados por HPLC, 0.02-15 mgL⁻¹.

As condições de operação foram os 550 nm e o espectrofotómetro é o representado na figura abaixo.



Figura G 1- Espectrofotómetro da Aveleda, Jasco V530

Foram criados então 6 soluções padrão, partindo de uma solução mãe, no entanto o valor mais baixo assumiu absorvância zero, não sendo por isso incluído na reta abaixo.

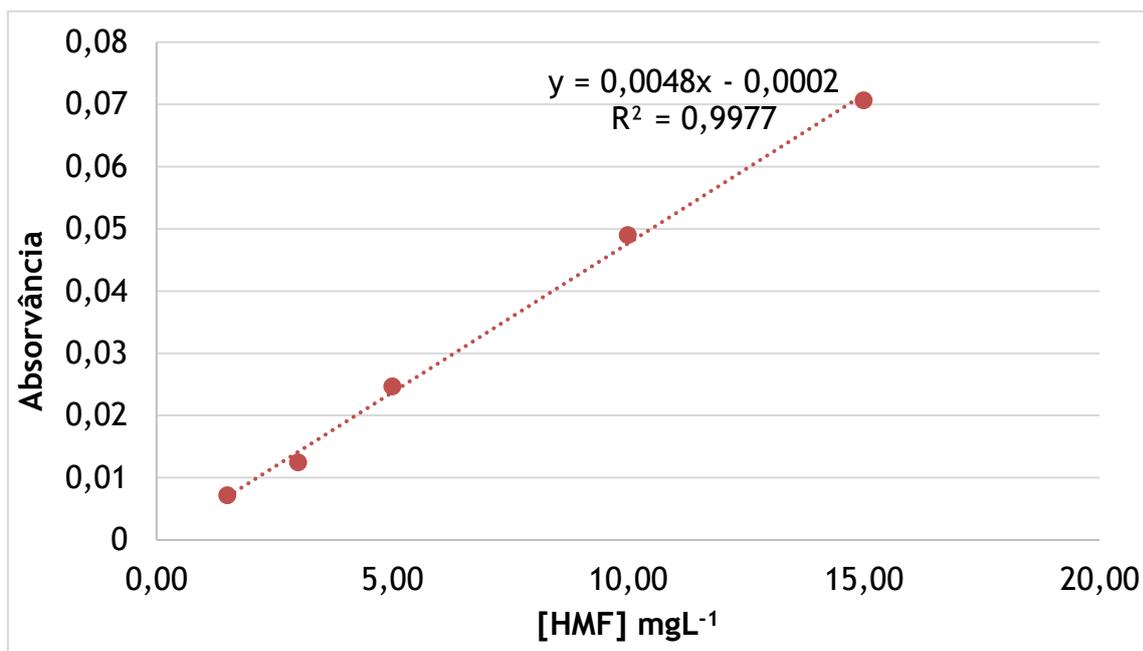


Figura G2- Curva de calibração para o método de espectrofotometria de análise do HMF

Com a equação da reta acima, ainda se testou uma concentração de um vinho conhecida (determinada anteriormente por HPLC).

No QA, armazenado a 40 °C, a absorvância medida foi de 0,0126, obtendo-se uma concentração de 2,67 mg/L, sendo que quando determinada por HPLC foi de 2,42 mg/L