

Mestrado Integrado em Engenharia Química

*Estudos de Migração do 2,4,6-tricloroanisol
através de Vedantes*

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial

Tânia Sofia Teixeira Lopes

Amorim & Irmãos S.A.



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP



Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: **Prof. Adélio Mendes**

Orientador na empresa: **Prof. Miguel Cabral**

Fevereiro de 2008

“Na escrita chinesa a palavra crise é composta por dois caracteres: um representa perigo e o outro oportunidade.”

John F. Kennedy

Agradecimentos

A presente investigação realizou-se no Departamento de Investigação & Desenvolvimento da empresa Amorim & Irmãos S.A. sob a direcção do Professor Doutor Miguel Cabral e do Professor Doutor Adélio Mendes, a quem desejo expressar, em primeiro lugar, o meu mais sincero agradecimento pelo interesse demonstrado pelo meu trabalho de investigação.

Desejo agradecer de forma muito especial, ao Doutor Paulo Lopes, à Doutora Isabel Roseira e ao Doutor Stephan Dahl a dedicação mostrada ao longo de todo o estágio, pelos bons conselhos e ajuda constante.

Conste o meu mais sincero agradecimento às colaboradoras do I & D, Eliana Reis, Salomé Reis e Patrícia Oliveira, pela boa disposição, dedicação, por todo o apoio recebido.

Um muito obrigado à amiga sempre presente, Joana Sampaio, pela sua boa disposição em ajudar a todo momento, pelos seus bons conselhos, pela companhia e pelos bons momentos.

Agradeço à minha família e amigos mais próximos por todo o apoio, compreensão e carinho durante a investigação.

Resumo

A contaminação de vinho com aromas fúngicos é geralmente vista como uma das piores ameaças para as caves em todo o mundo. Este fenómeno tem sido, tradicionalmente e de forma errada, associado exclusivamente à cortiça. No entanto, tendo em consideração as diferentes e múltiplas fontes de contaminação, o termo mais apropriado é contaminação por cloroanisóis (especialmente o 2,4,6-tricloroanisol ou TCA).

Utilizando o procedimento de contaminação artificial otimizado, injectou-se deutério-2,4,6-tricloroanisol em rolhas de cortiça natural. As rolhas não contaminaram o vinho após 9 dias do seu engarrafamento. No entanto, internamente as rolhas de cortiça natural ainda permaneciam contaminadas.

De modo a avaliar a migração de d₅-TCA, expuseram-se garrafas vedadas com rolhas naturais, rolhas técnicas Neutrocork e vedantes sintéticos Nomacorc *Classic* a uma atmosfera muito contaminada. No primeiro mês, sob as mesmas condições de contaminação e conservação, as rolhas sintéticas foram as únicas que apresentaram níveis de migração de d₅-TCA ao longo do primeiro terço do vedante. Contrariamente, as rolhas de cortiça demonstraram ser uma barreira efectiva à transferência de TCA' exógenos.

Palavras Chave: 2,4,6-tricloroanisol, migração, rolhas de cortiça, vedantes sintéticos

Abstract

Cork taint is one of the most serious problems for wine and cork industries worldwide. The migration of 2,4,6-tricloroanisole (TCA) from cork stoppers to wine is studied under different experimental conditions.

By the optimized artificial contamination procedure, deuterium-labelled 2,4,6-tricloroanisole (d_5 -TCA) was inject in natural cork stoppers. After 9 days of bottle storage with the contaminated cork stoppers they did not contaminate the wine. Although inside the cork stoppers there was contamination traces.

Wine bottles sealed with natural cork stoppers, “technical” corks (Neutrocork), and synthetic closures (Nomacorc) were exposed to a saturated taint atmosphere saturated in order to assess the migration of d_5 -TCA into bottles. The d_5 -TCA migrated throughout the first 12.7 mm of synthetic closure body during the first month. Contrarily and under the conditions of this study, cork closures proved to be effective barriers to the transmission of exogenous TCA.

Keywords: 2,4,6-trichloanisole, migration, cork stoppers, synthetic closures

Índice

Notação e Glossário	iii
1. Introdução	1
1.1. Natureza dos Aromas Fúngicos.....	1
1.2. Estrutura química dos haloanisóis e halofenóis	2
1.3. Origem dos halofenóis e haloanisóis.....	3
1.3.1. Origem dos clorofenóis	3
1.3.2. Mecanismos moleculares da formação de cloroanisóis a partir de clorofenóis.....	4
1.4. A Contaminação do vinho por cloroanisóis	6
1.4.1. Contaminações atribuíveis à cortiça.....	6
1.5. Contributos do trabalho.....	7
1.6. Organização da tese.....	8
2. Cloroanisóis e o estado da arte relativo à contaminação de vinhos	9
3. Estudo da migração de d ₅ -TCA do interior da rolha natural para o vinho	12
3.1. Metodologia	12
3.1.1. Optimização do método de contaminação intencional das rolhas de cortiça natural.....	12
3.1.2. Condições de realização do ensaio de migração do interior da rolha para o vinho	14
3.2. Resultados	16
3.2.1. Optimização do método de contaminação intencional das rolhas de cortiça natural.....	16
3.2.2. Condições de realização do ensaio de migração do interior da rolha para o vinho	21
4. Estudo da migração de d ₅ -TCA atmosférico para o interior de uma garrafa de vinho.....	23
4.1. Metodologia	23
4.1.1. Resultados da migração de d ₅ -TCA do exterior da garrafa para o vinho	26
5. Conclusões	29
6. Avaliação do trabalho realizado.....	30
6.1. Objectivos Realizados	30
6.2. Outros Trabalhos Realizados	30
6.3. Limitações e Trabalho Futuro	30
6.4. Apreciação final	31
Referências.....	32
7. Anexos.....	36
7.1. Método de Análise – SPME- GC/MS	36
7.1.1. Equipamento e reagentes	37
7.1.2. Preparação de amostras para análise no GC/MS.....	40
7.1.3. Calibração.....	41

7.2.	Colocação de amostras no cromatógrafo.....	45
7.2.1.	Condicionamento da coluna.....	45
7.2.2.	Colocação das amostras no suporte do GC.....	45
7.2.3.	Tratamento dos Resultados do GC/MS.....	46
7.3.	Controlo do perfil do gargalo.....	49
7.4.	Propriedades das rolhas utilizadas no estudo de contaminação atmosférica.....	51

Notação e Glossário

Lista de Siglas

2,4,6-TCA	2,4,6-tricloroanisol
2,3,4,6-TeCA	2,3,4,6-tetracloroanisol
PCA	Pentacloroanisol
2,4,6-TBA	2,4,6-tribromoanisol
2,4,6-TCP	2,4,6-triclofenol
2,3,4,6-TeCP	2,3,4,6-tetraclorofenol
PCP	Pentaclorofenol
2,3,4,6-TeBA	2,3,4,6-tetrabromoanisol
CPOMT	Clorofenol <i>O</i> -metiltransferase
d ₅ -TCA	Deutério 2,4,6-tricloroanisol
SPME	microextração em fase sólida
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
CVRVV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes

1. Introdução

A contaminação de vinho com aromas fúngicos é geralmente vista como uma das piores ameaças para as caves em todo o mundo. Este fenómeno tem sido, tradicionalmente e de forma errada, associado exclusivamente à cortiça, sendo designado por «gosto a rolha». O uso repetido e indiscriminado do termo «gosto a rolha» tem contribuído para a propagação da ideia, quer entre os técnicos das caves, quer entre o público em geral. No entanto, tendo em consideração as diferentes e múltiplas fontes de contaminação, o termo mais apropriado seria contaminação por cloroanisóis (especialmente o 2,4,6-tricloroanisol ou TCA). Este composto orgânico pode conferir um desagradável aroma fúngico ao vinho, até mesmo em concentrações tão baixas como $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

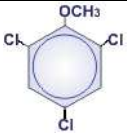
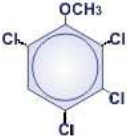
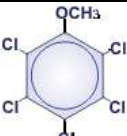
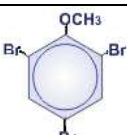
Calcula-se que só no Estado da Califórnia, um valor entre \$180 e \$360 milhões (USD), seja desperdiçado todos os anos pela contaminação da cortiça. No entanto, muitas pessoas tomam este valor como exagerado. Outros especialistas referem que os prejuízos acumulados para as caves, desde que se conhece este problema, ascenderiam a cerca de \$1 000 milhões (USD) (Chatonnet, 2004).

1.1. Natureza dos Aromas Fúngicos

Os aromas fúngicos existentes são uma consequência da presença de microrganismos (especialmente fungos filamentosos) no meio (ar, água, madeira, etc.), que quando em contacto com halofenóis (presente em alguns pesticidas altamente tóxicos), desenvolvem um mecanismo de defesa que conduz à produção de haloanisóis (Coque *et al.* 2003). Estes pesticidas são os clorofenóis, fluorfenóis, iodofenóis e bromofenóis (ver figura 1.1).

Os haloanisóis são agentes contaminantes de elevada importância. Estes são capazes de “destruir” os aromas e gostos originais de qualquer vinho. As suas características mais relevantes são o facto de produzirem odores desagradáveis definidos como, mofo ou bafio, e de possuírem um limiar de percepção olfactivo muito baixo em solução alcoólica – ver tabela 1.1.

Tabela 1.1. Limiares de percepção dos principais cloroanisóis e bromoanisóis envolvidos, segundo dados de vários autores, na contaminação de vinhos (Coque *et al.*, 2006)

Composto	Limiar de detecção	Estrutura
2,4,6 – TCA	Em água: 30 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Curtis <i>et al.</i> ; Griffiths, 1974) Em solução alcoólica (vinho): 1,5 – 3 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Duerr, 1985)	
2,3,4,6-TeCA	Em água: 4 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Curtis <i>et al.</i> , 1974) Em solução alcoólica (vinho): ✓ 10 – 15 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (branco e tinto) (Chatonnet, P., 2004) ✓ 5 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (vinhos espumosos) (Chatonnet, P., 2004)	
PCA	Composto organolépticamente fraco Limiar de detecção - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Chatonnet, P., 2004)	
2,4,6-TBA	Em água: 8 - 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Saxby <i>et al.</i> , 1982; Whitfield <i>et al.</i> , 1997) Em solução alcoólica (vinho): 43 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Chatonnet, P., 2004)	

De uma maneira geral, estes compostos são muito voláteis, sendo facilmente transmitidos através do ar e demonstrado uma grande afinidade para aderir e contaminar a madeira, cortiça e muitos outros materiais como polímeros plásticos, silicone, cartão e papel, borracha, etc. (Simpson *et al.*, 2005).

1.2. Estrutura química dos haloanisóis e halofenóis

Estruturalmente, podem ser considerados derivados do anisol (ou metoxibenzeno), contendo nas suas moléculas, pelo menos um átomo de halogénio. O anisol é um composto derivado do fenol, presente numa grande variedade de substâncias voláteis, que são normalmente odoríficas. Existem quatro elementos halogénicos: flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) e iodo (I). Quando um átomo de halogénio está presente numa molécula de anisol, o composto daí resultante é denominado de haloanisóis, que dependendo do halogénio presente na molécula podem posteriormente originar fluoranisóis, cloroanisóis, bromoanisóis ou iodoanisóis, figura 1.1.

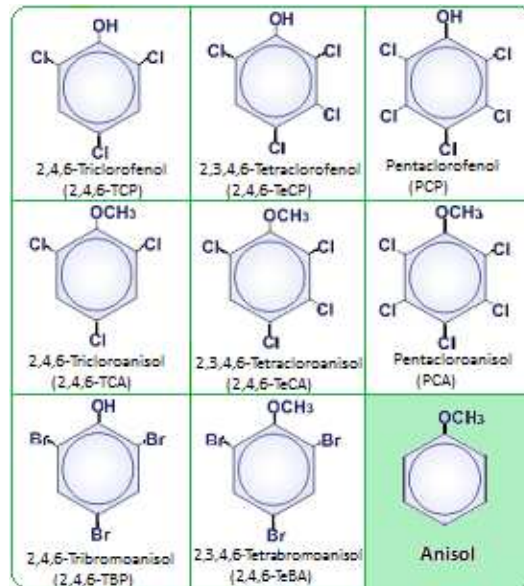


Figura 1.1. Estrutura química do anisol, dos halofenóis mais importantes (clorofenóis e bromoanisóis) e dos haloanisóis envolvidas na contaminação do vinho (Coque *et al.*, 2006).

1.3. Origem dos halofenóis e haloanisóis

Os clorofenóis e bromofenóis são os halofenóis mais utilizados nos processos industriais de produção de pesticidas. Estes, podem ser transformados em haloanisóis pela acção biológica de alguns microrganismos, fundamentalmente, os fungos filamentosos, capazes de levar a cabo a reacção de biometilação descrita na figura 1.3 (Coque *et al.*, 2003).

1.3.1. Origem dos clorofenóis

Os clorofenóis não são considerados compostos naturais. São compostos orgânicos sintéticos muito recalcitrantes que podem permanecer no ecossistema por um longo período de tempo, são obtidos industrialmente em larga escala através da coloração fenólica ou da hidrólise de clorobenzenos.

A sua utilização tem-se verificado sobretudo enquanto fungicidas, de modo a proteger a madeira de ataques fúngicos, como também, de meio de prevenção do crescimento de fungos em materiais utilizados para embalagem, como o cartão, as peles,

e os tecidos. Como consequência, tornam-se num dos grupos mais importantes de contaminantes e podem ser detectados em qualquer ecossistema – ver figura 1.2.

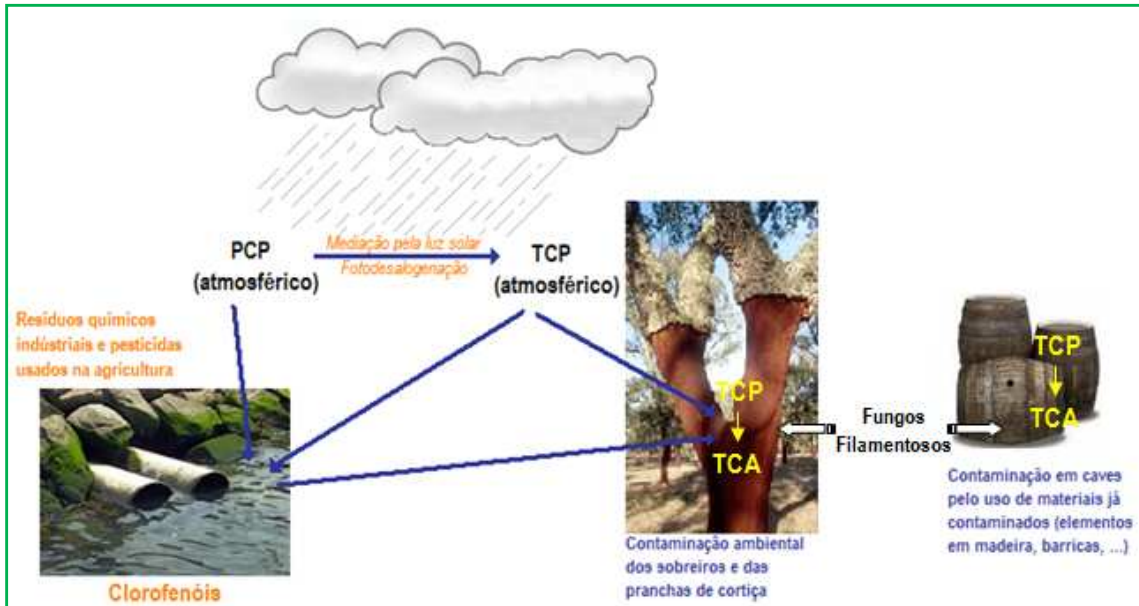


Figura 1.2. Origem ambiental dos clorofenóis e cloroanisóis em processos de contaminação da cortiça, madeira e outros materiais (Coque *et al.*, 2006).

O uso de clorofenóis é actualmente proibido na Europa devido às suspeitas de ser cancerígeno. Todavia, continua a ser utilizado na Ásia, África e América do sul.

Tomando em consideração todos estes dados podemos constatar que a provável contaminação do vinho pode ter origem a dois níveis:

- ✓ Através da contaminação de cortiça produzida directamente na floresta ou no montado de sobreiro por exposição a clorofenóis; ou por contaminação das pranchas de cortiça durante o processo produtivo.
- ✓ Por meio da contaminação do vinho ou dos vedantes, durante o seu armazenamento na própria cave, geralmente por contaminação da madeira nas estruturas (paredes, tectos, pavimentos), barricas ou estantes para armazenamento das garrafas.

1.3.2. Mecanismos moleculares da formação de cloroanisóis a partir de clorofenóis

Várias hipóteses foram propostas para explicar a origem de cloroanisóis quer na cortiça, quer nas caves, actualmente, a única origem cientificamente provada da

presença de 2,4,6-TCA na cortiça está na biometilação de 2,4,6-TCP – ver figura 1.3. (Coque et al., 2006).



Figura 1.3. Mecanismo de formação pelo fungo *Trichoderma longibrachiatum* do 2,4,6-TCA por *O*-metilação de 2,4,6-TCP numa reacção catalizada pela enzima clorofenol *O*-metiltransferase (CPOMT).

A reacção de biometilação é maioritariamente executada por fungos filamentosos que crescem quer nas pranchas de cortiça, quer nos elementos de madeira existentes nas caves (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002). A reacção é conduzida por uma proteína (enzima) denominada por clorofenol *O*-metiltransferase (CPOMT), que pode metilar uma série de halofenóis (incluindo clorofenóis, bromofenóis e iodofenóis) (Coque *et al.* 2003) de forma a produzir os haloanisóis correspondentes.

Devido à sua elevada toxicidade, assim que os fungos filamentosos detectam a presença de clorofenóis no meio, tentam por todas as formas a sua desactivação (destoxificação ou eliminação da toxicidade), uma vez que, de outra forma poderiam sucumbir ou sofrer de danos capazes de afectar a sua fisiologia.

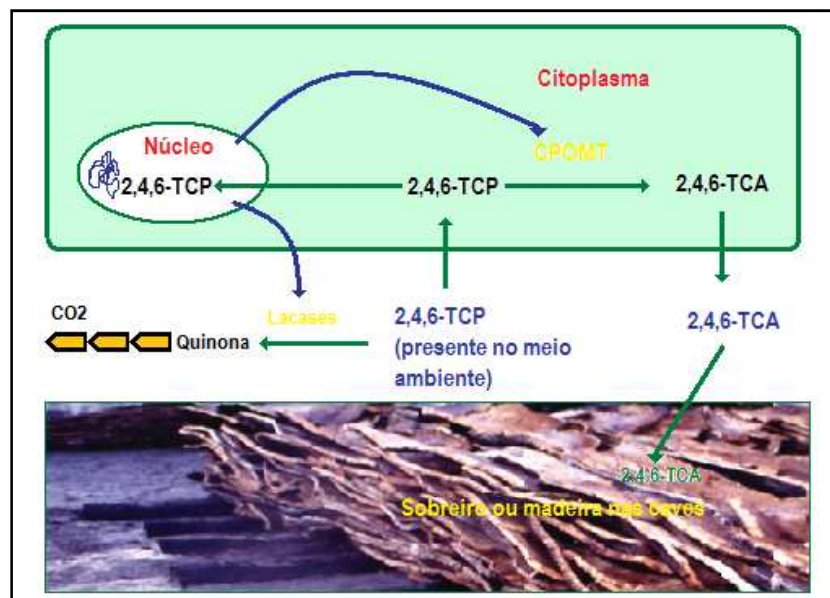


Figura 1.4. Possíveis mecanismos de biotransformação de 2,4,6-TCP por fungos filamentosos e origem de 2,4,6-TCA (e outros anisóis) na cortiça e na madeira (Cque *et al.*, 2005)

1.4. A Contaminação do vinho por cloroanisóis

A verdadeira origem da contaminação de vinho por cloroanisóis reside num problema de contaminação ambiental.

Não obstante, partindo do facto que um número limitado de casos pode ocorrer do emprego de rolhas de cortiça com defeito. Podemos afirmar que a abordagem, quase exclusiva da rolha enquanto agente contaminante é demasiado simplista e por essa razão requer uma análise mais rigorosa, visto que, existem outras fontes de contaminação. De facto, é possível detectar, em algumas caves, vinhos contaminados que nunca estiveram em contacto com a cortiça (Chatonnet *et al*, 2004).

1.4.1. Contaminações atribuíveis à cortiça

Vários estudos sugerem que a rolha de cortiça seria a responsável por um número significativo de casos de contaminação de vinho. Existe, contudo uma certa falta de clareza no que concerne à contaminação atribuível à cortiça. Deste modo, são possíveis duas situações claramente diferentes:

- I. **A rolha de cortiça enquanto agente contaminante.** Nesta situação, quando a rolha chega à cave já possui níveis de haloanisóis inaceitáveis. A origem desta contaminação pode ser diferente:
 - Em certas situações, a contaminação é oriunda da própria floresta, quando o casco da árvore absorve halofenóis que foram transportados através da atmosfera ou pela água da chuva, ou então, atingem de forma accidental a cortiça do sobreiro (ver figura 1.2.). Nessa altura os fungos filamentosos que habitam nos solos e no sobreiro iriam desintoxicar estes pesticidas por degradação ou por transformação em haloanisóis, mantendo-se retidos na cortiça. Este tipo de contaminação pode arrastar-se ao longo do processo produtivo contaminando, desta, a rolha.
 - Noutros casos, as pranchas de cortiça chegam limpas às indústrias corticeiras, contudo, a rolha é contaminada. Neste caso, podemos

verificar que há uma ou mais fontes de haloanisóis nas indústrias, uma vez que, durante o processo produtivo estes compostos vão sendo absorvidos.

- II. A rolha de cortiça enquanto elemento propagador de contaminação:** A rolha de cortiça, assim como, a madeira e os polímeros plásticos, tem uma grande capacidade de absorver cloroanisóis que são transmitidos por via aérea, mesmo sem um contacto físico directo com a fonte primária de contaminação. Esta absorção é muito rápida e pode ocorrer num curto período de tempo (24 horas) (Barker *et al.*, 2001). Por conseguinte, a rolha de cortiça actuará como veículo transmissor da contaminação, mas a origem desta encontra-se na própria cave.

Neste contexto, e conscientes da importância deste problema, esta investigação tem como objectivo definir e implementar estratégias que visam o estudo da migração do 2,4,6-TCA a dois níveis: verificar se o TCA atmosférico é susceptível de atingir o vinho atravessando diferentes tipos de vedante; estudar a hipotética migração de TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho.

1.5. Contributos do trabalho

A Amorim & Irmãos S.A. está consciente da importância da problemática da contaminação de vinho por haloanisóis, neste contexto criou um departamento de Investigação & desenvolvimento.

Este projecto de investigação é um complemento de um estudo que decorre nesse departamento na área da migração de 2,4,6-tricloroanisol do interior da rolha cortiça para o vinho, com a mais-valia de nesta pesquisa se estudar a migração de TCA's atmosféricos através de diferentes tipos de vedantes (rolha de cortiça natural e técnica de cortiça e vedante sintético).

O principal contributo deste projecto foi na clarificação do mecanismo de contaminação do vinho a partir da rolha de cortiça natural. Qual o efeito barreira de diferentes vedantes quando expostos a um ambiente contaminado com 2,4,6-TCA,

permitindo perspectivar-nos se as novas tecnologias de produção de rolhas são suficientes para eliminar este problema, e se a contaminação é ou não, única e exclusivamente da responsabilidade da rolha de cortiça.

1.6. Organização da tese

Esta tese está dividida em seis capítulos.

No capítulo 1, a Introdução enquadra o leitor sobre alguns conceitos essenciais relativos à contaminação de vinhos por haloanisóis e dá uma perspectiva geral desta problemática e é onde estão apresentados os objectivos em que se baseia a presente investigação.

No capítulo 2 está descrito o estado de arte sobre problema da contaminação onde se referenciam estudos relacionados que serviram de apoio à presente investigação.

No capítulo 3 encontram-se as metodologias adoptadas e os resultados referentes ao primeiro ponto do estudo da migração de d_5 -TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho.

No capítulo 4 é apresentada a metodologia do estudo de migração de 2,4,6-tricloroanisol exógeno para o interior da garrafa através de trêstipos de vedantes, cortiça natural, rolha técnica de cortiça e vedante sintético e é onde se expõem os resultados relativos ao primeiro ponto de análise.

No capítulo 5 encontram-se as conclusões gerais de ambos os estudos de migração do 2,4,6-tricloroanisol para o interior da garrafa.

Por último, dedica-se o 6º capítulo à avaliação geral do trabalho realizado.

2. Cloroanisóis e o estado da arte relativo à contaminação de vinhos

O 2,4,6-TCA tem vindo a ser associado como o principal responsável pela contaminação de uma variedade de produtos alimentícios, como por exemplo, frutos secos, águas, óleos essenciais, ovos, entre outros. (Land *et al.*, 1975; Frijti and Bemelman 1977; Whitfield *et al.*, 1991; Aung *et al.*, 1996).

O 2,4,6-TCA, foi o primeiro composto a ser identificado como sendo a causa dos aromas fúngicos, (Buser *et al.*, 1982) e agora é visto como o principal responsável pela contaminação de vinhos (Buser *et al.*, 1982, Amon and Simpson, 1986; Amon *et al.*, 1989; Jäger *et al.*, 1996, Hervé *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2005). Numa amostra de vinhos comerciais presentes a uma avaliação, 18 das 374 garrafas em estudo (4,8%) foram identificadas, pelo menos por 20% dos provadores, como estando contaminadas com aromas fúngicos. Posteriormente, essas 18 garrafas foram sujeitas a análises químicas e foi detectada uma concentração igual ou superior a $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4,6-TCA (Pollnitz *et al.*, 1996). Foi também detectada a presença de 2,4,6-TCA nas rolhas das garrafas de vinho que estavam contaminadas. Hervé *et al.* (2004) reportaram que, 70-80% das rolhas de cortiça rejeitadas por controlos de qualidade estavam realmente contaminadas com 2,4,6-TCA. Peña-Neira *et al* (2000) analisaram 46 amostras de vinho com aromas fúngicos, o 2,4,6-TCA estava presente em concentrações superiores a $4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ em 80% das amostras analisadas. Rigaud *et al.* (1984) analisaram 12 vinhos afectados e em todos eles encontraram o composto 2,4,6-TCA.

Soleas *et al.* (2002) analisaram 2400 vinhos comerciais de vários países. Este estudo, consistiu numa prova de vinhos por parte de uma equipa de experientes provadores que detectaram contaminações por aromas fúngicos em 145 desses vinhos (6%). Quando estes foram analisados no GC-MS só 71 deles (49%) apresentavam níveis de TCA mais elevados que o limiar de percepção de $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, em 35% dos vinhos analisados no GC-MS não foi detectado nenhum TCA (limite de detecção $0,1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).

O 2,4,6- TCA é de facto um dos compostos responsáveis pela contaminação de vinhos. Contudo, é questionável o papel da rolha de cortiça enquanto único agente responsável pela transferência desse composto ao vinho engarrafado. A proporção de rolhas contaminadas por TCA detectadas em avaliações de qualidade efectuadas por

uma das maiores caves australianas foi de cerca de 1%, sendo este valor inferior ao que encontra na generalidade dos vinhos engarrafados na Austrália (cerca de 5%) (ou 9,8% segundo Soleas *et al.*, 2002) (Sefton and Simpson (2005).

Chatonnet *et al.* (2004) na análise de 30 vinhos identificaram o composto 2,4,6-TBA, como responsável por um gosto a mofo semelhante ao produzido pelo 2,4,6-TCA e verificaram que a contaminação não é atribuível à rolha mas sim à cave uma vez que, os vinhos contaminados nunca estiveram em contacto com a cortiça. Pascal Hervé (laboratórios ETS, Califórnia, EUA) afirmou que «A média de TCA libertável nas rolhas analisadas diminuiu em 80% no período entre 2001 e 2005». Se a média de TCA encontrada em rolhas de cortiça diminuiu nos últimos anos é questionável que a incidência deste problema permaneça tão elevada.

Nesta perspectiva e atendendo a que a rolha de cortiça, assim como, a madeira e os polímeros plásticos, tem uma grande capacidade de absorver cloroanisóis que são transmitidos por via aérea, mesmo sem um contacto físico directo com a fonte primária de contaminação e que esta absorção é muito rápida podendo ocorrer num curto período de tempo (24 horas) (Barker *et al.*, 2001), caso a rolha de cortiça ou até mesmo os vedantes sintéticos estejam em contacto com ambientes contaminados tal pode-se traduzir numa absorção de cloroanisóis, passíveis de serem transmitidos ao vinho.

Todavia, constatou-se que a adição de d₅-TCA à superfície externa de rolhas de cortiça natural, não contaminou o vinho, num período de 3 anos após o engarrafamento (Capone *et al.*, 2002). Contudo, os vedantes cilíndricos são permeáveis ao oxigénio (Lopes *et al.*, 2006). Segundo Lopes *et al.* (2007) para a rolha de cortiça natural a interface cortiça-vidro é uma das vias de entrada, já no caso da rolha sintética, ocorre directamente através do “corpo” do vedante. Ainda não se realizaram estudos que mostrem se o 2,4,6-TCA migra através dos diferentes tipos de vedantes para o interior da garrafa, seguindo o mesmo mecanismo que o oxigénio.

Por outro lado, pode acontecer, no caso da cortiça, que a contaminação ocorra na própria floresta, quando o casco da árvore absorve os halofenóis do meio ambiente que são transformados em haloanisóis pela acção de certos fungos (mecanismo de biometilação) (Sefton *et al.*, 2005). Neste tipo de contaminação, produzida na floresta ou em montados de sobro, a distribuição do 2,4,6-TCA na cortiça não é uniforme (Amon e Simpson, 1986; Pollnitz *et al.*, 1996; Howland *et al.*, 1997). Este problema da variação da localização do TCA nas rolhas do mesmo lote até mesmo da mesma árvore,

é sobretudo das rolhas naturais e explica o facto de apenas alguns vinhos, engarrafados com rolhas igualmente contaminadas, estarem contaminados (Pollnitz *et al.* 1996, Capone *et al.*, 1999). Tal pode ocorrer porque a rolha apenas consegue transmitir ao vinho o 2,4,6-TCA que se encontra na superfície que entra em contacto com este (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999 e 2002). Por outro lado, não existem referências bibliográficas que avaliem a possibilidade, de o TCA que está contido no interior da rolha contamine o vinho engarrafado.

Esta investigação complementa e prorroga os estudos acima referidos. A nossa proposta foi investigar a migração do 2,4,6-TCA atmosférico para o interior da garrafa em diferentes tipos de vedantes e estudar a migração do interior da rolha de cortiça natural.

3. Estudo da migração de d₅-TCA do interior da rolha natural para o vinho

Vários estudos sugerem que a rolha de cortiça seria responsável por um número significativo de casos de contaminação de vinho, embora não existam estudos rigorosos que confirmem com exactidão a percentagem destes casos.

Este capítulo destina-se ao estudo da migração de d₅-TCA do interior da rolha natural para a garrafa, propusemo-nos a estudar um caso extremo de contaminação, isto é, contaminar a rolha com uma grande quantidade de d₅-TCA. Utilizou-se deutério-2,4,6-TCA para não haver alterações no resultado, caso a rolha natural já estivesse contaminada com 2,4,6-TCA.

3.1. Metodologia

Numa fase inicial foi necessário definir, otimizar e implementar o método de contaminação, baseados em artigos científicos e estudos realizados, antes de se iniciar o estudo de migração propriamente dito.

3.1.1. Optimização do método de contaminação intencional das rolhas de cortiça natural

Tendo em atenção, estudos anteriormente realizados (tabela 3.11) definiram-se as variáveis que afectavam a contaminação intencional da rolha: concentração e volume da solução de d₅-TCA a injectar e o solvente de contaminação

Tabela 3.1. Referências utilizadas na optimização do método de contaminação intencional das rolhas.

2002	Capone <i>et al.</i> utilizou uma solução de d ₅ -TCA (1080 ng) em <i>n</i> -pentano e contaminou o topo da rolha natural com 10 µL de solução;
2004	Fortes <i>et al.</i> escreveu que a cortiça tem grande afinidade para os <i>n</i> -alcanos;
2005	Juanola <i>et al</i> utilizou como solvente o <i>n</i> -hexano e contaminou as rolhas com 1 µL de uma solução com concentração de 0,4 mg·L ⁻¹ .

Num primeiro ensaio foram comparados dois *n*-alcanos como solvente a uma concentração elevada de d_5 -TCA, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Era determinante que as rolhas ficassem bastante contaminadas, de modo a simular uma situação extrema.

A metodologia seguida neste primeiro teste foi a adoptada pelos investigadores que conduziram o estudo de migração do interior da rolha de cortiça para o vinho a decorrer no departamento I&D.

Protocolo de contaminação:

Numa balança analítica pesou-se 2 mg de cristais de d_5 -TCA (CDN Isótopos, Alemanha) e adicionou-se um volume de 20 mL do solvente. Vedou-se o frasco imediatamente com papel de alumínio e fechou-se. Guardou-se a solução no congelador.

Com auxílio de um marcador e de uma régua, marcou-se uma cruz no centro da rolha (figura 3.1). Com uma lâmina assinalou-se um comprimento de 13 mm em duas agulhas de seringa. Uma das agulhas serviu para abrir o canal por onde seria injectada a solução na rolha.

Na hotte, com uma micropipeta colocou-se $30 \mu\text{L}$ de solução contaminante numa caixa de *Petri* e aspirou-se a gota com uma seringa de 2 mL. Imediatamente a seguir, arrastou-se o êmbolo da seringa ligeiramente para cima e com o papel humedecido em etanol 96% (Manuel Vieira e Companhia Irmãos SUCRS, L&d, Portugal) e limpou-se a agulha para evitar uma contaminação cruzada de rolha para rolha. Injectou-se a solução na rolha de cortiça natural e tapou-se o orifício com cola Araldite Ceys®. Deixou-se secar e estabilizar durante 48 horas à temperatura ambiente

Repetiu-se o procedimento para 15 rolhas de cortiça naturais para ambos os solventes em estudo (*n*-pentano e *n*-hexano Merck, Canadá). No momento da injeção verificou-se se existiam perdas de solução pelos canais naturais da rolha, caso tal se verificasse esta era imediatamente rejeitada.

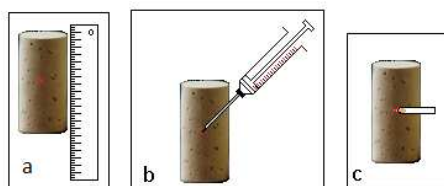


Figura 3.1. Esquema de contaminação das rolhas de cortiça natural.

Após período de estabilização, macerou-se as rolhas contaminadas em solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) durante 24 horas. Quantificou-se o d_5 -TCA superficial da rolha por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa GC-MS (anexo 7.1). Posteriormente, analisou-se o nível de d_5 -TCA no interior da rolha seccionando-a vertical e horizontalmente a partir da marca de injeção (figura 3.2). Macerou-se individualmente cada uma das partes.



Figura 3.2. Esquema de corte da rolha para quantificação do d_5 -TCA no interior.

Com base nos resultados obtidos no primeiro estudo, realizou-se um segundo ensaio de optimização da metodologia de contaminação. Substituiu-se o *n*-hexano por etanol, a concentração da solução de d_5 -TCA utilizada foi de $56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e injectou-se um volume de $10 \mu\text{L}$. Substituiu-se a micropipeta, a caixa de *Petri* e a seringa de 1 mL por uma microseringa de $10 \mu\text{L}$ de capacidade.

Finalmente, mantendo o procedimento de contaminação do ensaio 1 com as alterações do ponto dois realizou-se um terceiro estudo onde apenas se substituiu a concentração da solução de d_5 -TCA para $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.1.2. Condições de realização do ensaio de migração do interior da rolha para o vinho

Foi determinado que o estudo da migração do d_5 -TCA do interior da rolha para o vinho seria de 36 meses, com medições periódicas de d_5 -TCA no vinho e nas rolhas naturais aos 9, 30 dias, 3, 6, 12, 18, 24 e 36 meses.

Seguiu-se o protocolo de contaminação da rolha de cortiça descrito no ponto anterior e contaminaram-se cerca de 200 rolhas de cortiça natural com uma solução de d_5 -TCA solubilizado em etanol (96%) a uma concentração de $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Encheram-se 72 garrafas tipo bordalesa de 375 mL (perfil do gargalo em anexo) com vinho branco, Marquês de Cáceres, 2007 (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Propriedades físico química do vinho branco Marquês de Cáceres, realizada pela CVRVV.

Ensaio Método	Análise Físico-Química	
	Resultado	Unidade
Título alcoométrico volúmico adquirido MI 108, ed. 04 (espectrofotometria de infravermelho próximo)	13	% vol.
Massa volúmica MI 109, ed. (densimetria electrónica)	0,98835	g·cm ³
Extracto seco total MI 016, ed. 04 (cálculo)	18,5	g·dm ³
Extracto não redutor MI 043, ed. 04 (cálculo)	16,5	g·dm ³
Açúcares Redutores MI 017, ed. 07 (SFA)	2	g·dm ³
Acidez total Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 13 (titulação potenciométrica)	4,4	g(ácido tartárico)·dm ³
Acidez volátil MI 009, ed.07 (SFA)	0,3	g(ácido acético) ·dm ³
Acidez fixa Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 15	4	g(ácido tartárico) ·dm ³
pH Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 24	3,39	
Dióxido de enxofre livre MI 104, ed. 02 (titulação potenciométrica)	14	mg·dm ³
Dióxido de enxofre total MI 104, ed. 02 (titulação potenciométrica)	138	mg·dm ³
Título alcoométrico volúmico total MI 004, ed. (cálculo)	13,1	% vol.
Relação álcool peso/ Extracto não redutor MI 027, ed. 04 (cálculo)	6,3	



Das 200 rolhas contaminadas e isentas de TCA's superficiais escolheram-se aleatoriamente 72, as que restaram foram utilizadas como controlo do nível de contaminação em cada período de análise.

Posteriormente procedeu-se ao ensaio de engarrafamento das 72 garrafas de vinho com as rolhas intencionalmente contaminadas (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Condições de engarrafamento

Rolhadora:	Bertolazo Epsilon R/S
Volume de enchimento:	370 mL ± 1,70 mm
Nível de enchimento:	62,18 mm ± 1,70 mm
Temperatura do líquido:	20,5 °C
Depressão no headspace após engarrafamento:	-0,3 bar

Após engarrafamento, armazenaram-se as garrafas, em posição horizontal numa câmara climática Chambrair (Alemanha) à temperatura de $16\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, com humidade não controlada. As rolhas de controlo foram submetidas às mesmas condições de conservação.

Em cada período de tempo analisaram-se 9 garrafas; a extracção da rolha efectuou-se com auxílio de um saca-rolhas italiano, munido de duas pinças que retirou a rolha sem a perfurar. Retirou-se uma amostra de vinho de cada garrafa seguindo o protocolo descrito no anexo 7.1. De seguida, seccionou-se a rolha em quatro partes (figura 3.2) e quantificou-se o nível de d_5 -TCA em cada uma por GC-MS com padrão interno d_5 -TBA (anexo 7.1). Finalmente avaliou-se o nível de contaminação superficial e interno de d_5 -TCA em 5 rolhas de controlo (figura 3.3.).



Figura 3.3. Esquema do modo de seccionamento da rolha de cortiça natural em quatro partes

3.2. Resultados

3.2.1. Optimização do método de contaminação intencional das rolhas de cortiça natural

Pela análise do gráfico 3.1. verificamos que superficialmente, a rolha ficou bastante contaminada. Não sendo esse o nosso objectivo encontramos aqui o primeiro obstáculo no procedimento adoptado no primeiro ensaio. Tal pode ter ocorrido devido às altas concentrações a que trabalhamos e à injeção de um volume de solução relativamente elevado. Por vezes, verificou-se que a rolha não conseguia absorver a quantidade injectada verificando-se perdas de solução pelo canal de entrada.

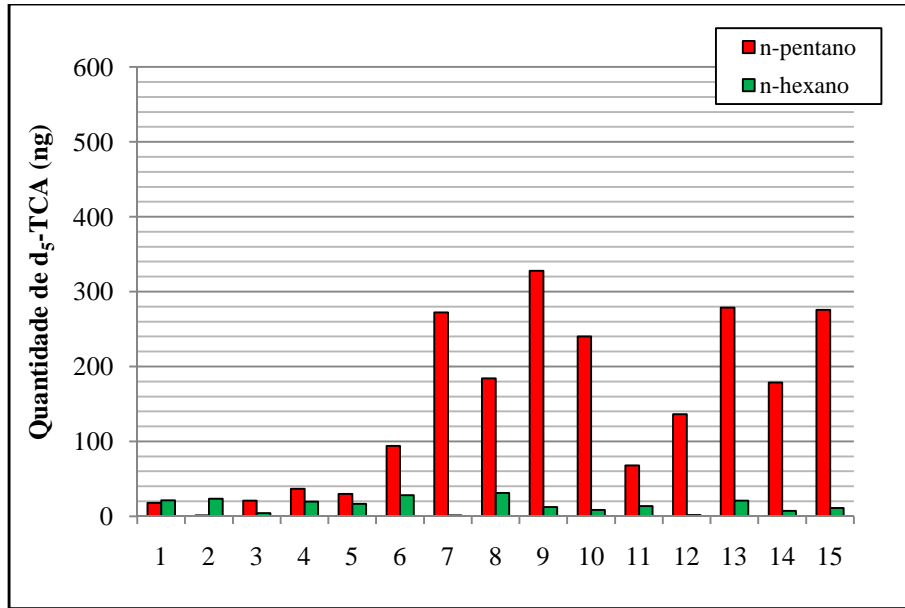


Figura 3.1. Contaminação superficial das rolhas de cortiça com d₅-TCA. Comparação entre os solventes *n*-pentano e *n*-hexano.

Tendo em atenção que no processo de maceração das quatro partes que compunham a rolha, para quantificação do nível de contaminação interna, o d₅-TCA que se encontrava na superfície externa da rolha foi novamente quantificado.

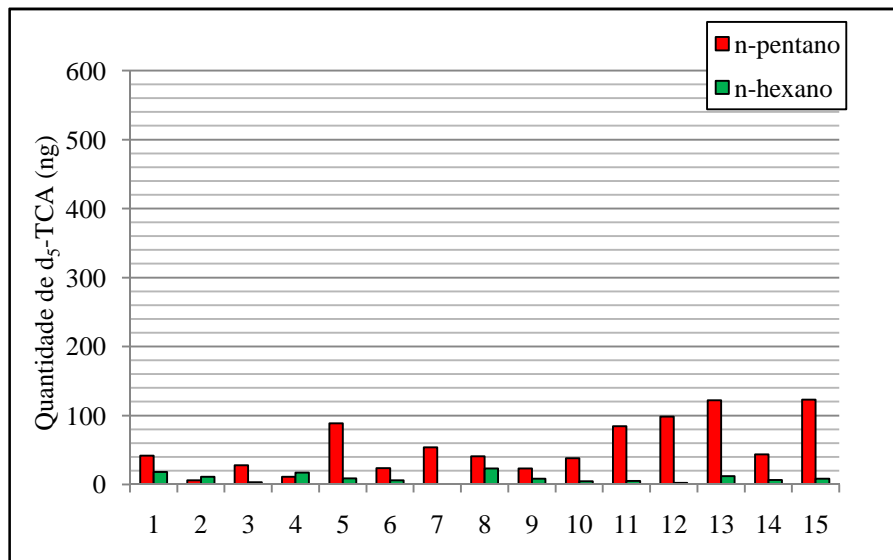


Figura 3.2. Quantidade total de d₅-TCA nas quatro secções da rolhas para ambos os solventes em estudo.

Pela observação das figuras 3.1 e 3.2, verificamos que só em algumas rolhas é que se conseguiu contaminar o seu interior, se tivermos em consideração, no caso do

solvente *n*-hexano a contaminação teórica inicial foi de 3450 ng e de 4050 ng para o caso do *n*-pentano, vemos aqui alguma ineficácia do método. As diferenças entre as quantidades observadas para ambos os solventes em estudo, indicam-nos que aquele que melhor contamina a rolha é o *n*-pentano.

Neste primeiro teste, deparamo-nos com algumas dificuldades, nomeadamente a contaminação superficial, este é um factor negativo uma vez que, o TCA exógeno iria ser transmitido ao vinho (Pollnitz *et al.*, 1996 e Capone *et al.* 1999 e 2002).

Os resultados acima discutidos podem ser explicados, por uma “deficiência” inerente ao processo de contaminação utilizado. Isto é, em termos de metodologia o ponto seis do protocolo de contaminação, demonstrou algumas falhas, na medida que, verificaram-se perdas significativas no processo de absorção da gota da caixa de *Petri*.

Num segundo ensaio procurou-se um novo solvente para substituir o *n*-hexano, é do nosso conhecimento que os *n*-alcanos têm grande afinidade para com a cortiça (Fortes *et al.*, 2005). No entanto a compatibilidade dos *n*-alcanos para com o TCA pode não ser a mesma. Assim, procurou-se, na bibliografia, um solvente que solubilizasse o composto TCA; o escolhido foi o etanol (Índex Merk, 2001). Sendo assim neste segundo estudo utilizou-se o *n*-pentano e o etanol como solventes. Após alguns ensaios preliminares optou-se por reduzir o volume de solução e a quantidade a injectar, 56 mg·L⁻¹.

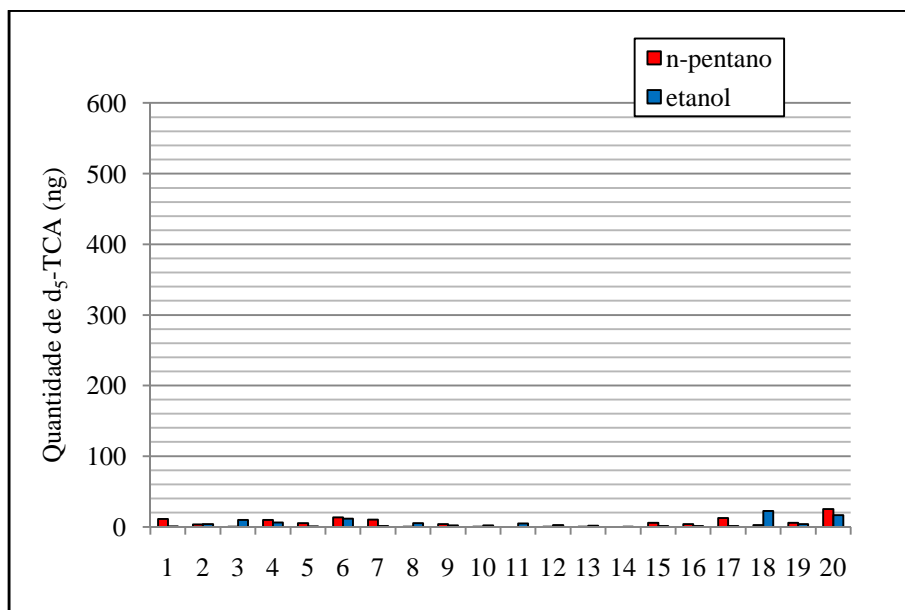


Figura 3.3. Contaminação superficial das rolhas de cortiça com d₅-TCA. Comparação entre os solventes *n*-pentano e etanol.

Pela observação do gráfico 3.3 podemos constatar que superficialmente as rolhas ficaram menos contaminadas, havendo reduções na ordem dos 300 ng. Contudo, ainda são visíveis certos níveis de contaminação superficial. De forma a ultrapassar esta situação, decidiu-se tratar as rolhas com um sistema de descontaminação de TCA, desenvolvido pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos S.A. Este, tem por base uma destilação a vapor controlada, capaz de expulsar os compostos presentes nos grânulos e rolhas de cortiça. O tratamento foi efectuado com temperatura e humidade controladas durante 6 horas. Os resultados obtidos após medição do d_5 -TCA superficial, demonstram eficácia reduzindo os valores de d_5 -TCA para valores inferiores a 0,2 ng.

Podemos verificar pela análise do gráfico 3.4 que internamente as rolhas estavam pouco contaminadas. Não sendo esse o nosso objectivo, uma vez que queríamos simular uma contaminação extrema, foi necessário aumentar novamente a concentração da solução. Contudo, as alterações a nível de protocolo parecem ter dado resultado, uma vez que, o nível de contaminação interior é bastante homogéneo. Outra observação interessante é o facto de o etanol contaminar melhor o interior da rolha.

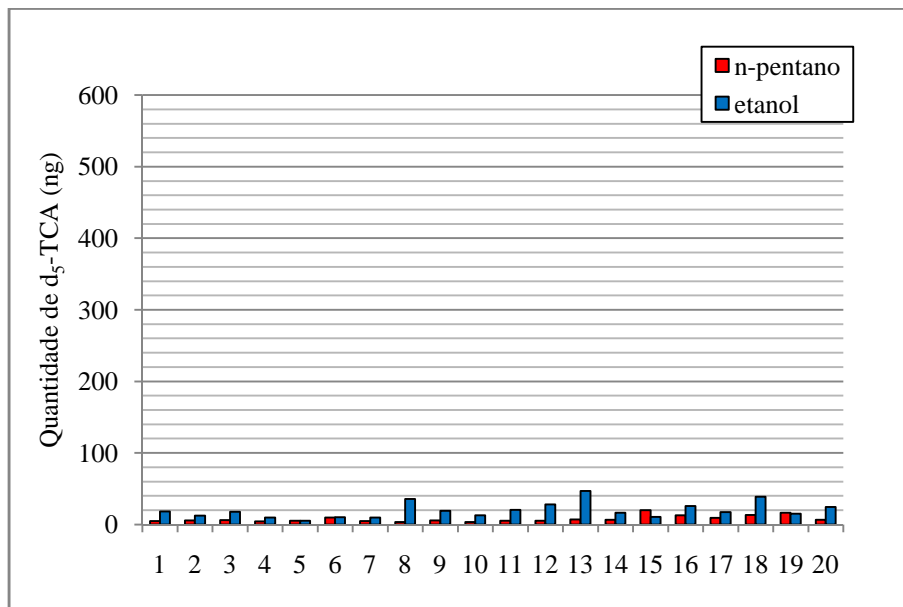


Figura 3.4. Quantidade total de d_5 -TCA nas quatro secções das rolhas de cortiça natural para ambos os solventes em estudo. Quantidade teórica inicial de d_5 -TCA de 560 ng.

Finalmente, a análise global dos obtidos reunindo conduziu a um terceiro ensaio onde se procurou avaliar o efeito dos solventes *n*-pentano e etanol, agora a uma concentração de d_5 -TCA de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

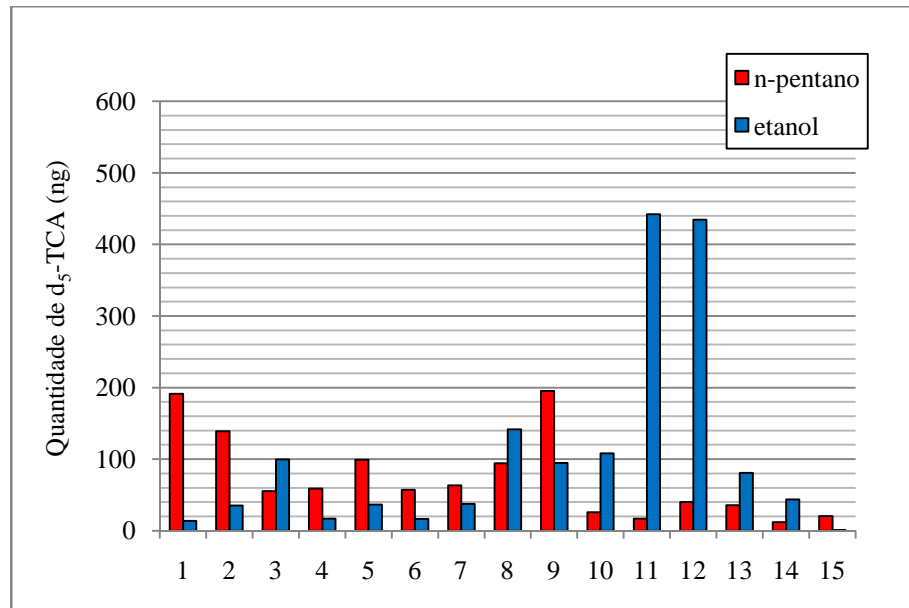


Figura 3.5. Contaminação superficial das rolhas de cortiça natural com d₅-TCA. Comparação entre os solventes *n*-pentano e etanol.

Pela análise da figura 3.5 torna-se evidente o facto de o TCA ser uma substância muito volátil e com grande afinidade para com a cortiça o facto de ser impossível contaminar o interior da rolha, sem obrigatoriamente contaminar o seu exterior. Contudo, o tratamento de descontaminação permite eliminar todo o TCA superficial das rolhas, independentemente do solvente utilizado.

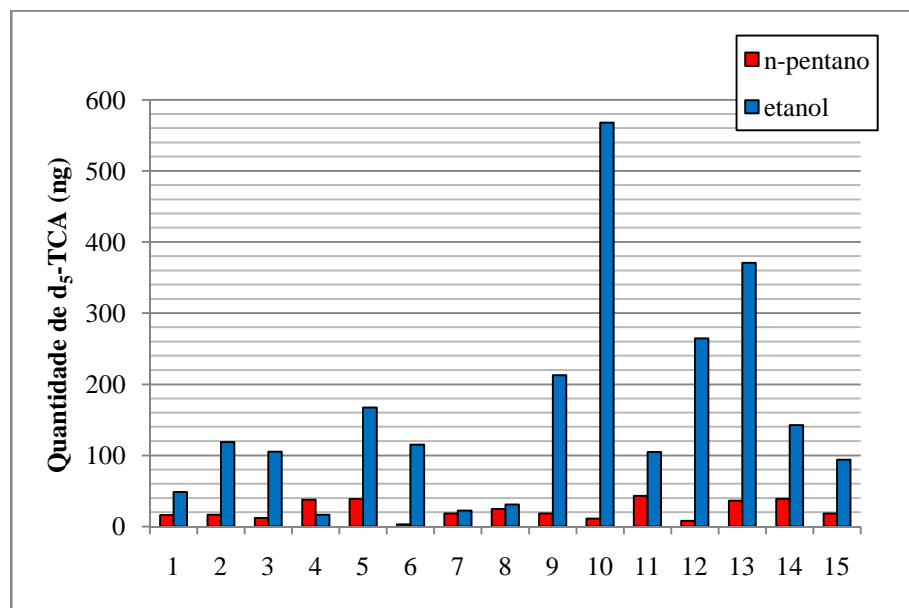


Figura 3.6. Quantidade total de d₅-TCA nas quatro secções da rolha de cortiça natural para ambos os solventes em estudo. Quantidade teórica inicial de d₅-TCA de 1000 ng

Pela análise da figura 3.6, podemos verificar que o etanol consegue contaminar mais eficazmente o interior da rolha. Embora, exista alguma heterogeneidade nos resultados, que provavelmente está associado à heterogeneidade das rolhas de cortiça natural. Todavia, podemos verificar que 67% das rolhas contaminadas com etanol apresentam um valor superior a 100 ng, e que todas as rolhas contaminadas estão de facto contaminadas (figura 3.6).

3.2.2. Condições de realização do ensaio de migração do interior da rolha para o vinho

Este estudo tem um tempo de investigação relativamente longo (36 meses). Como o estágio de mestrado em que se inseriu este projecto teve a durabilidade de 6 meses, 3 dos quais, em processo de optimização de estratégias e implementação de metodologias, apenas foi possível avaliar o primeiro ponto do estudo da migração do interior da rolha de cortiça natural para o vinho.

Após nove dias de conservação verificou-se níveis de d₅-TCA não detectáveis no vinho. Este facto, facto parece estar de acordo com estudos anteriormente realizados que mostraram que a rolha apenas consegue transmitir ao vinho o TCA que esteja na superfície em contacto com este (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999 e 2002). Contudo, estes resultados apenas dizem respeito a 9 dias de engarrafamento, ou seja, pouco tempo para questionarmos a possibilidade do d₅-TCA intrínseco migrar nos primeiros meses juntamente com o ar contido nas células da cortiça. Verificamos no entanto que as rolhas estavam internamente contaminadas.

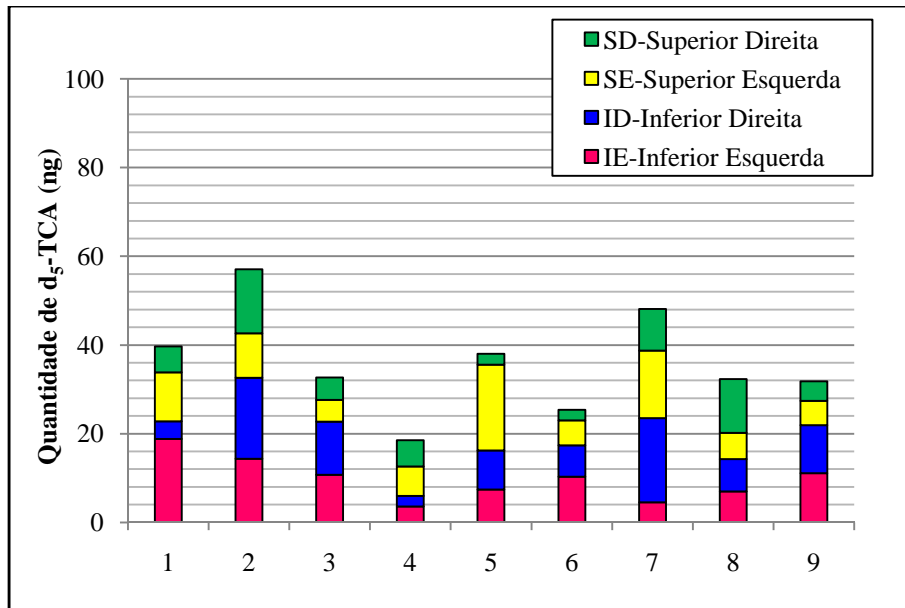


Figura 3.7. Quantidade de d_5 -TCA em cada uma das secções que compunham a rolhas de cortiça, previamente contaminada com 1000 ng.

Superficialmente as rolhas de controlo apresentam níveis não detectáveis de d_5 -TCA. Contudo, internamente as rolhas cortiça natural constituídas para controlo ainda permaneciam contaminadas após 9 dias de conservação.

4. Estudo da migração de d₅-TCA atmosférico para o interior de uma garrafa de vinho

Neste capítulo, propusemo-nos a estudar, em que medida o d₅-TCA migra através de diferentes tipos de vedantes para o vinho. Utilizou-se deutério-2,4,6-TCA para não haver alterações no resultado, caso a rolha natural já estivesse contaminada com 2,4,6-TCA.

4.1. Metodologia

O estudo foi planeado para 48 meses de forma a simular um ensaio de engarrafamento de longa duração. Foram previstas medições periódicas de d₅-TCA no vinho e nos vedantes aos 1, 3, 6, 12, 24 e 48 meses de conservação, analisando-se 15 frascos, 5 para cada tipo de vedante em estudo.

Foram testados três diferentes tipos de vedantes, rolhas naturais qualidade superior (38 mm de comprimento por 24 mm de diâmetro), rolhas técnicas Neutrocork (38 mm x 24 mm) e rolhas sintéticas Nomacorc *Classic* (37 mm x 24 mm). As rolhas de cortiça foram cedidas pela Amorim & Irmãos S.A. (Santa Maria de Lamas, Portugal) e as rolhas sintéticas pela Nomacorc S.A. (Thimister-Clermont, Bélgica). As propriedades físicas dos vedantes utilizados no ensaio encontram-se descritas no anexo 7.3.

A metodologia de contaminação adoptada para este estudo teve como base o artigo de Barker *et al.* (2001). Este, numa das suas experiências colocou pranchas de cortiça dentro de uma caixa de vidro, expostas a três ambientes contaminados com diferentes quantidades de d₅-TCA, 1000 µg, 2000 µg e 4000 µg. Os resultados obtidos demonstraram que a quantidade absorvida está relacionada com a concentração inicialmente introduzida, isto é, quanto maior for a concentração maior será a absorção. Em todas as quantidades adicionadas por Barker *et al.* se verificaram grandes níveis contaminação pelo que, no nosso estudo se optou por usar a intermédia. Barker *et al.* contaminaram uma de caixa de 66 L com uma quantidade de 2000 µg. No nosso estudo pretendeu-se contaminar frascos de 2 L. Logo:

$$\text{Quantidade de } d_5 - \text{TCA} = \frac{2L \times 2000 \mu g}{66 L} \cong 60 \mu g \quad (3.1)$$

Do mesmo modo, calculou-se o volume de solução a colocar no frasco, sabendo que Barker *et al.* colocou 1 mL temos:

$$\text{Volume de Solução} = \frac{2 L \times 1 mL}{66 L} = 0,03 mL = 30 \mu L \quad (3.2)$$

Neste estudo, além da avaliação do d_5 -TCA também foi nosso objectivo estudar a migração do $^{13}\text{C}_6$ -TCP pelo que, a solução de contaminação foi preparada adicionando massas iguais de ambos os compostos.

A solução foi preparada da seguinte forma: num frasco de 5 mL pesou-se 2,1 mg de d_5 -TCA e 2,5 mg de cristais de $^{13}\text{C}_6$ -TCP, adicionou-se com auxílio de uma pipeta um volume de 4 mL de etanol 96%.

Antes de se contaminar os frascos, encheu-se 90 meias garrafas de vinho, com solução hidroalcoólica (12 % de etanol v/v). Estas garrafas foram em seguida arrolhadas com os diferentes vedantes (acima descritos) segundo as condições apresentadas na tabela 3.3.

Tabela 4.1. Condições de engarrafamento.

Rolhadora:	Bertolazo Epsilon R/S
Volume de enchimento:	370 mL \pm 2,2 mm
Nível de enchimento:	60,8 mm \pm 2,2 mm
Temperatura do líquido:	20,0 °C
Depressão no <i>headspace</i> após engarrafamento:	-0,4 bar (para os três tipos de vedantes);

Após concluídas as etapas anteriores deu-se início à contaminação atmosférica propriamente dita: colocou-se uma garrafa dentro de um frasco (figura 3.4.), pipetou-se 30 μL da solução contaminante e aplicou-se a gota na parede do frasco. De seguida, cobriu-se imediatamente o topo do frasco com papel de alumínio, vedando-se com parafilme e finalmente fechou-se o frasco. Repetiu-se o procedimento para todas as 90 garrafas do ensaio (figura 3.4.).



Figura 4.1. Esquema do dispositivo de contaminação atmosférica.

Para analisar o nível de contaminação atmosférica do frasco, em cada período seguiu-se o procedimento descrito no anexo 7.1.

De forma a analisar a contaminação das vedantes efectuou-se um corte com uma lâmina no vidro do gargalo da garrafa e bateu-se com este num local duro. De seguida analisou-se a solução hidroalcoólica (procedimento descrito em anexo). Com auxílio de um martelo partiu-se o vidro do gargalo que envolvia a rolha. Finalmente seccionaram-se as rolhas em três partes que foram maceradas individualmente a fim de quantificar o nível de d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP-acetato.



Figura 4.2. Esquema de corte da rolha.

4.1.1. Resultados da migração de d₅-TCA do exterior da garrafa para o vinho

Em semelhança com o estudo anterior, também este, tem um tempo de ensaio relativamente longo (48 meses). Pela mesma razão anteriormente referida, apenas se avaliou o primeiro ponto do ensaio da migração de TCA's exógenos para o interior da garrafa.

Após o primeiro mês de conservação verificou-se que, os 15 frascos estavam ainda contaminados com d₅-TCA e ¹³C₆-TCP_{acetato}. Contudo, podemos observar uma grande variação na quantidade média de d₅-TCA que ainda permanece nos frascos das garrafas vedadas com rolhas de cortiça de natural, possivelmente devido a dois valores que condicionaram o resultado (p <0,05).

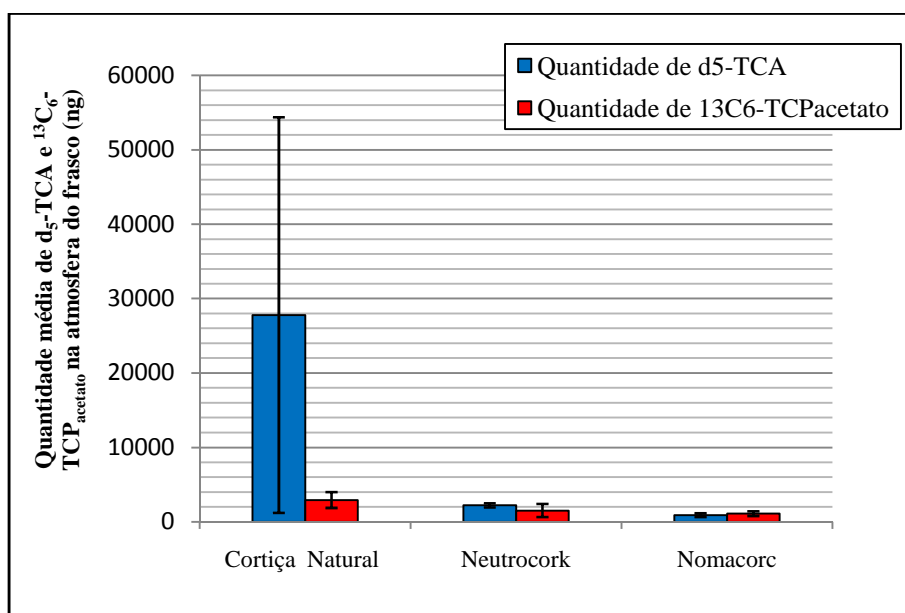


Figura 4.3. Quantidade média (n=5) de d₅-TCA e de ¹³C₆-TCP_{acetato}, extraída da atmosfera do frasco após um mês de conservação contaminada inicialmente com 63675 ng(2·L_{gás})⁻¹ e com 73575 ng(2·L_{gás})⁻¹. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

A atmosfera envolvente às garrafas vedadas com rolhas Neutrocork, mostram um nível de contaminação superior ao das rolhas sintéticas. Verifica-se uma tendência dos vedantes sintéticos absorverem mais TCA.

Na quantificação de d_5 -TCA nas três partes em que seccionaram os vedantes, podemos observar, pela análise da figura 4.4 que a rolha de cortiça natural absorve significativamente mais TCA no 1º terço (a parte que está em contacto com a atmosfera) que os outros vedantes ($p < 0,01$). Estes resultados mostram claramente que muito do TCA que encontramos em algumas rolhas de cortiça pode ter uma origem ambiental e que essa absorção é muito rápida (Barker *et al.*, 2002; Chatonnet *et al.*, 2004). Podemos verificar também que, não só a rolha de cortiça é capaz de sorver cloroanisóis atmosféricos, como também o vedante sintético. Os plásticos, assim como a cortiça têm uma grande capacidade de sorção de cloroanisóis (Sefton *et al.*, 2005).

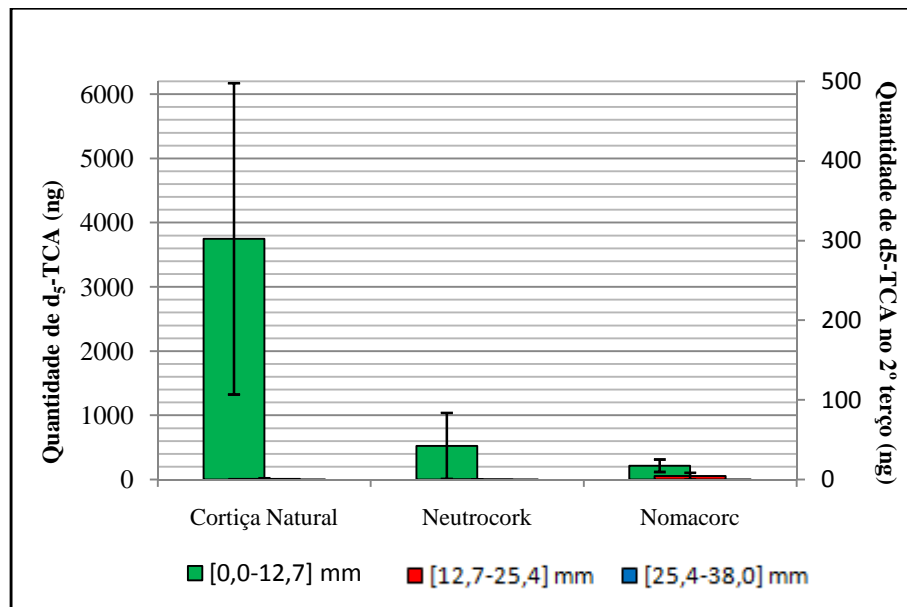


Figura 4.4. Média da quantidade de d_5 -TCA nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

Embora, o vedante sintético seja aquele que está menos contaminado no topo externo, é também o que apresente níveis mais baixos de contaminação ambiente nos frascos. Na análise do 2º terço do vedante sintético, constatamos que existe uma tendência de migração, uma vez que, detectou-se d_5 -TCA. Se tivermos em consideração o estudo de Lopes *et al.* (2007) que reporta que a principal via de entrada do oxigénio através do vedante Nomacorc ocorre principalmente através do seu “corpo”, hipoteticamente uma grande quantidade de d_5 -TCA estará localizada ao longo do 1º e 2º terço do vedante Nomacorc.

Tendo em consideração o facto do rolha de cortiça natural ser um produto 100% natural torna-se difícil prever o seu comportamento, contudo neste primeiro ponto de análise observamos a função da rolha de cortiça natural como barreira à migração do d_5 -TCA. Sendo a mais contaminada na superfície externa, a rolha de cortiça natural, não apresenta níveis de migração para o interior do vedante. Pelo contrário, o vedante sintético mostrou-se parcialmente incapaz de impedir a migração do d_5 -TCA.

Em relação ao TCP podemos constatar que tem maior afinidade para com as rolhas de cortiça natural e Neutrocork. Em semelhança com o d_5 -TCA também foi visível a migração de $^{13}C_6$ -TCP até ao 2º terço do vedante sintético, após um 1 mês de conservação (figura 4.5).

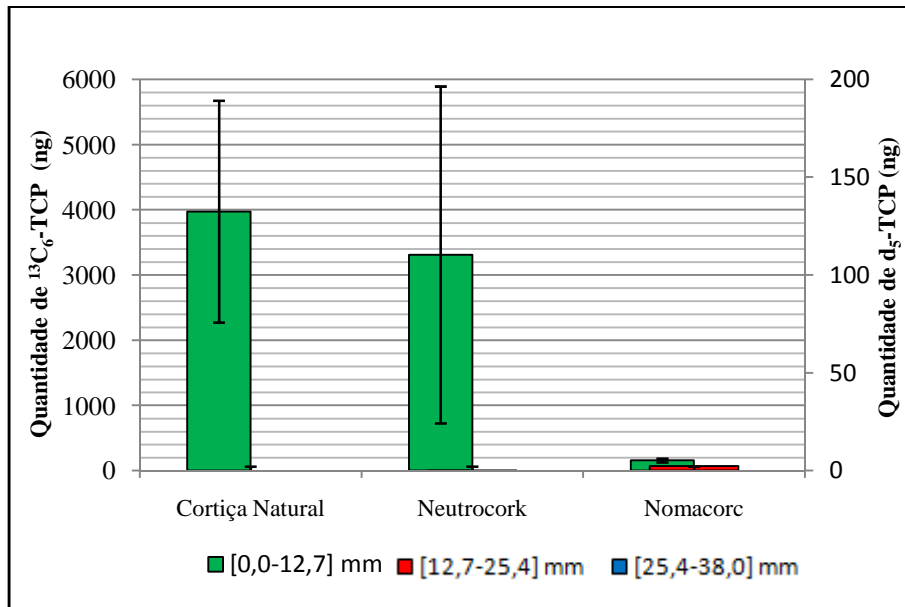


Figura 4.5. Média da quantidade de $^{13}C_6$ -TCP nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

Não se verifica uma relação entre a migração, quer do d_5 -TCA quer do $^{13}C_6$ -TCP, dos vedantes em estudo e das partes consideradas ($p < 0,001$).

Este estudo apenas teve em consideração o primeiro ponto do ensaio, após um mês de conservação. O factor tempo, é muito importante neste tipo de estudos de migração de 2,4,6-TCA para o interior da garrafa. Contudo, já se observam algumas tendências interessantes.

5. Conclusões

No âmbito do presente projecto de investigação, foi feita a optimização do procedimento de contaminação artificial de rolhas de cortiça natural, utilizando etanol (96 %) como solvente, utilizadas no estudo de migração do interior da rolha para o vinho.

Após nove dias do engarrafamento, verificou-se que o d_5 -TCA presente no interior das rolhas artificialmente contaminadas não migrou para o vinho. No entanto, internamente as rolhas ainda permanecem contaminadas.

A atmosfera dos frascos de ensaio manteve-se contaminada após 1 mês de conservação. Todos os vedantes sorvem d_5 -TCA, mas o vedante sintético apresenta a maior permeabilidade a este contaminante, uma vez que este foi detectado no segundo terço axial do vedante.

As perspectivas do trabalho são boas, na medida em que, mostra-se uma hipotética migração nos vedantes sintéticos e se verifica um efeito barreira das rolhas de cortiça, quando expostos a um ambiente contaminado com d_5 -TCA.

Este trabalho apresenta-se assim como um contributo fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de contaminação do vinho com cloroanisóis. A hipotética migração de TCA através dos vedantes sintéticos e o efeito barreira ao TCA proporcionado pelas rolhas de cortiça, serão argumentos de uma enorme valia científica e comercial para a Amorim & Irmãos S.A.

6. Avaliação do trabalho realizado

6.1. Objectivos Realizados

Esta investigação teve como objectivo estudar a migração do 2,4,6-TCA a dois níveis. Verificar a susceptível migração de TCA's atmosféricos através de diferentes tipos de vedantes e estudar a hipotética migração de TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho. Os dois estudos foram implementados no tempo previsto. No entanto, devido à duração de ambos os ensaios apenas se analisou o primeiro ponto.

O factor tempo é muito importante neste tipo de estudos de migração de 2,4,6-TCA para o interior da garrafa. Contudo, já se pode verificar algumas tendências muito interessantes.

6.2. Outros Trabalhos Realizados

Durante todo este período de tempo, houve sempre colaboração com o laboratório de controlo de qualidade do departamento I&D da Amorim & Irmãos S.A., com o intuito de apreender o método de determinação do composto em estudo, o 2,4,6-TCA, essencial para a investigação.

Houve a realização de uma visita guiada às instalações da Equipar e Amorim Florestal, em Coruche e às da Amorim & Irmãos e Portocork, em Santa Maria de Lamas. Paralelamente ao estudo da migração do 2,4,6-TCA, cooperou-se com os investigadores do departamento noutros projectos de investigação em curso.

Realizou-se uma visita à CVRVV, participando em análises sensoriais.

6.3. Limitações e Trabalho Futuro

Numa fase inicial foi necessário definir, otimizar e implementar o método de contaminação, antes de se iniciar o estudo de migração propriamente dito. Esta etapa do trabalho consumiu algum tempo da investigação, uma vez que, a análise das amostras para quantificação do d₅-TCA estava limitada à rotina de análises do departamento, implicando muitas vezes atrasos.

O estudo de migração do d₅-TCA do interior da rolha natural e do exterior para o interior da garrafa foram planeados para 36 e 48 meses, respectivamente. Devido a se tratar de longos períodos de análise não foi possível concluir o projecto, nos seis meses de investigação. Contudo, reuniram-se todas as condições de modo a assegurar a continuação do projecto por parte da empresa.

6.4. Apreciação final

Este trabalho apresenta-se assim como um contributo fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de contaminação do vinho com cloroanisóis. A hipotética migração de TCA através dos vedantes sintéticos e o efeito barreira ao TCA proporcionado pelas rolhas de cortiça, serão argumentos de uma enorme valia científica e comercial para a Amorim & Irmãos S.A.

Referências

- Álvarez-Rodríguez, M.L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J.M., Rodríguez, E., Martínez, M.J., Larriba, G. e Coque, J.J.R. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by *o*-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied Environmental Microbiology*, **68**, 5860-5869 (2002).
- Amon, J.M. and Simpson, R.F. Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 268, 63-80 (1986).
- Amon, J.M., Vandepuer, J.M. and Simpson R.F. Compounds responsible for cork taint in wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, **4**, 62-69 (1989).
- Aung, L.H., Smilanick, J.L., Vail, P.V., Harstsell, P.L. and Gomez, E. Investigations into the origin of chloroanisoles causing musty off-flavor of raisins. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **44**, 3294-3296 (1996).
- Barker, D.A., Capone, D.L., Pollnitz, A.P., McLean, H.J., Francis, I.L., Oakey, H. e Sefton, M.A., Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via vapour phase in an enclosed environment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **7**, 40-46 (2001).
- Buser, H.R., Zanier, C. e Tanner, H. Identification of 2,4,6-chloroanisole as a potent compound causing cork-taint in wine. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **30**, 359-362 (1982).
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K. and Sefton, M.A. Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **8**, 196-199 (2002).
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Barker, D.A., McLean, H.J., Pollintz, A.P. and Sefton M.A. Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **5**, 91-98 (1999).
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. and Labadie, M.D. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1255-1262 (2004).
- Chatonnet, P., Índole, origen y consecuencia de la presencia de anisoles en el mundo vinícola. En Informe técnico: anisoles y Brettanomyces. Causas, efectos y

mecanismos de controlo. Fundación para la Cultura del Vino. (ed.). Pag. 9-19. Madrid, Espanha, 52, *Chapter 1 Introduction* (2004).

- Coque, J.J.R., Álvarez-Rodríguez, M.L., e Larriba, G. Characterization of an inducible chlorophenol *O*-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Applied Environmental Microbiolog.*, **69**, 5089-5095 (2003).
- Coque, J.J.R., Pérez, E.R., Goswami, M., Martínez, R.F., García, S.C., Rodríguez, Martín, J.F.M. Contaminação do Vinho por Haloanisóis: desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis, Versão Portuguesa, INBIOTEC, APCOR, Pag. 3-59, Santa Maria de Lamas, Portugal, 2006.
- Coque, J.J.R., Rodríguez M^a L.A., Martínez, R.F. Causas y orígenes de la contaminación del vino por Haloanisoles, INBIOTEC, ASECOR, Espanha, 2005.
- Curtis, R.F., Dennis, C., Gee, J.M., Griffiths, M.N., Land, D.G., Peel, J.L. e Robison, D. Chloroanisoles as a cause of musty taint in chickens and microbiological formation from chlorophenols in broiler house litter. *Journal of Agricultural Science*, **25**, 811-828 (1974).
- Duerr, P. Wine quality evaluation. En Proceedings of the International Symposium on cool climate viticulture and enology. Heatherbell, A., Lombard, P.D., Bodyfelt, F.W. And Price, S.E (editors), Cavallis, Oregon State University, USA (1985).
- Fortes, M.A., Rosa, M.E.; Pereira, H. A cortiça, 2^a ed, Instituto Superior Técnico. Lisboa, Portugal, 2006.
- Frijti, J.E.R. e Bemelman, J.M.H. Flavour sensitivity for chloroanisoles in coagulated egg yolk. *Journal of Food Science*, **42**, 1122-1123 (1977).
- Griffiths, N.M. Sensory properties of chloroanisoles. *Chem. Sens. Flavor*, **1**, 187-195 (1974).
- Hervé, E., Price, S., Burns, G. and Weber, P. Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork <http://www.corkfacts.com/banrmenu/archmainc.htm>. (2004).
- Howland, P.R., Pollintz, A.P., Liacopoulos, D., McLean, H.J., and Sefton, M.A. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **3**, 141-145 (1997).

- Jäger, J., Dieckman, L., Lorenz, D. and Jakob, L. (1996) Cork-borne bacteria and yeasts as potential producers of off-flavours in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2**, 35-41 (1996).
- Juanola, R., Subirá, D., Salvadó, J.A.G. Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *European Food Research and Technology*, **220**, No. 3/4, 347-352 (2005).
- Land, D.G., Gee, J.M. and Spinks, C.A. 2,4,6-trichloroanisole in broiler house litter: a further cause of musty taint in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1585 – 1591 (1975).
- Lemos, A.B., Potencial da microextração em fase sólida (SPME) em análises de embalagens, Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, 19, No 2, Junho 2007.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L and Glories, Y. Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 6741-6746 (2006).
- Lopes, P.; Saucier, C.; Teissedre, P. Main route of oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5167 – 5170 (2007).
- O’Neil, Maryadele J. Budavari S. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. 13^a ed. Whitehouse Station, NJ:Merck & Co.,2001.
- Peña-Neira, A., Fernández de Simón, B., Garcia-Vallejo, M.C., Hernández, T., Cadahía, E. and Suarez, J.A. Presence of cork taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *European Food Research and Technology*, **211**, 257-261 (2000).
- Pollintz, A.P., Pardon, K.H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G.K. and Sefton, M.A. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2**, 184-190 (1996).
- Queiróz, M.E.C., Lanças, F.M., Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência *Quimica. Nova*, **28**, No. 5, 880-886 (2005).

- Rigaud, J., Issanchou, S., Sarris, J. and Langlois, D. Incidence des composés volatils issus du liège sur le goût de bouchon des vins. *Sciences des Aliments*, **4**, 81-93 (1984).
- Saxby, M.J., Reid, W.J. e Wragg, G.S. Index of chemical taints, Leatherhead Food, RA. Leatherhead (1982).
- Simpson, R.F. Compounds causing cork taint and the factors affecting they transfer from natural cork closures to wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 226-240 (2005).
- Simpson, R.F., Capone, D.L., Duncan, B.C. and Sefton, M.A. Incidence and nature of ‘fungal must’ taint in wine corks. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, **20** (I), 26-31 (2005).
- Soales, G.J., Yan, J., Seaver, T. and Goldberg, D.M. Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1032-1039 (2002).
- Whitfield, F.B., Ly Nguyen, T.H., e Last, J.H. Effect of relative humidity and chlorophenol content on the fungal conversion of chlorophenols to chloroanisoles in fibreboard cartons containing dried fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**, 595-604 (1991).
- Whitfield, F., Hill, J.L. e Shaw, K.J. 2,4,6-tribromoanisole: a potencial cause of mustiness in package food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **45**, 889-893 (1997).

-

7. Anexos

7.1. Método de Análise – SPME- GC/MS

Para determinar e quantificar os compostos em estudo utilizou-se um método que conjuga uma técnica eficaz de extração, a microextração em fase sólida – SPME (Solid Phase Microextraction), com um método analítico suficientemente sensível, a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS).

A microextração em fase sólida, desenvolvida por Pawliszyn *et al* em 1990 é uma técnica cujo fundamento é a retenção dos analitos de interesse sobre uma fase estacionária constituída por um dispositivo de sílica fundida, em que uma das extremidades está recoberta por um fino filme polimérico - ver figura 7.1.

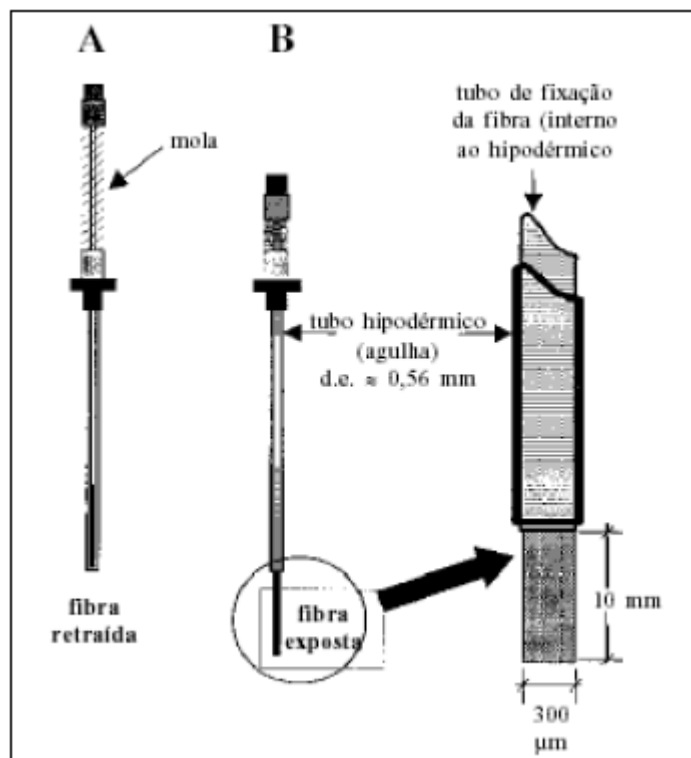


Figura 7.1. Dispositivo da fibra de SPME: (A) posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com fibra exposta.

Fonte: Lemos (2007).

A extracção/retenção dos compostos realizou-se pela exposição da fibra à fase gasosa, isto é, no espaço livre designado por *headspace*, em equilíbrio sobre a amostra (HS-SPME) – figura 7.2 (a).

Após o processo de extracção, os compostos são analisados por cromatografia gasosa, onde estes são termicamente dessorvidos para a coluna cromatográfica sob fluxo do gás de arrasto, figura 7.2 (b).

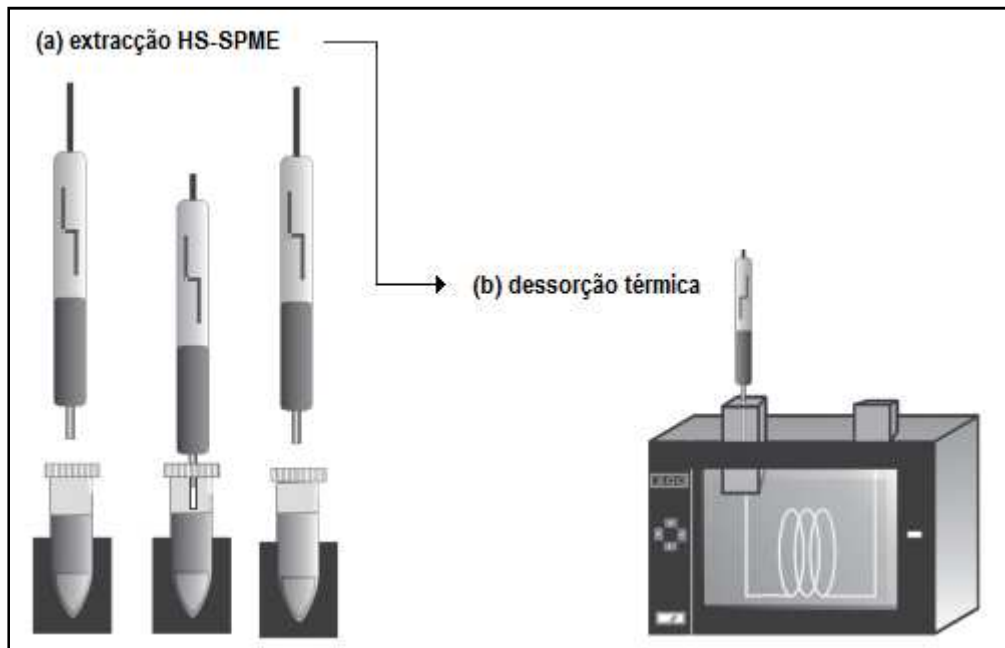


Figura 7.2. (a) Processo de extracção HS-SPME; (b) processo de dessorção térmica SPME-GC.

Fonte: Queiróz *et al.* (2005).

7.1.1. Equipamento e reagentes

Equipamento

- Cromatógrafo Gasoso: Agilent 6890;
- Detector: Espectroscopia de Massa Agilent 5973;
- *Auto-Sampler*: Gerstel MPS2, nº série 121694;
- Programa de aquisição de dados: Enhanced Chemstation, G1701CA Version C.00.00 21-Dec-1999, Copyright © Agilent Technologies 1989-1999.

Material e reagentes

- Vinho branco Marques de Cáceres, 2007;

- Solução hidroalcoólica a 12% (v/v);
 - Solução hidroalcoólica a 12%: adicionar 250 ml de Etanol 96% a 2 L de água destilada num balão volumétrico de 2 L.
- Solução de maceração.
 - *Para análise de d₅-TCA* - colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 ml a rolha (ou pedaço de rolha) que se pretende analisar o nível de d₅-TCA, completar o volume do mesmo com solução hidroalcoólica a 12% (v/v). Cobrir o frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa. Deixar em maceração durante 24 horas à temperatura ambiente.
 - *Para análise de ¹³C₆-TCP_{acetato}* - colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 ml a rolha (ou pedaço de rolha) que se pretende analisar o nível de ¹³C₆-TCP, completar o volume do mesmo com solução de carbonato de potássio, com uma concentração igual a 13,8 g/L. Cobrir o frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa. Deixar em maceração durante 24 horas à temperatura ambiente.

Nota: Quando se pretende analisar em simultâneo o nível de d₅-TCA e de ¹³C₆-TCP_{acetato} faz-se a maceração com carbonato de potássio.

- Padrão Interno: 100µg·L⁻¹ d₅-TBA em solução hidroalcoólica a 12% (v/v) em água destilada, com uma concentração de 100 µL·L⁻¹;
- Agente de Derivatização: 20 µg·L⁻¹ Ácido Anidrido Acético;
- HS-SPME: Fibra Sigma-Aldrich Co., com 100 µm de um revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS);
- Coluna: Varian, FactorFour™ Capillary Column VF-5ms 12 m x 0,20mm, 0,25 µm ID DF=0,33t, referência CP8935;

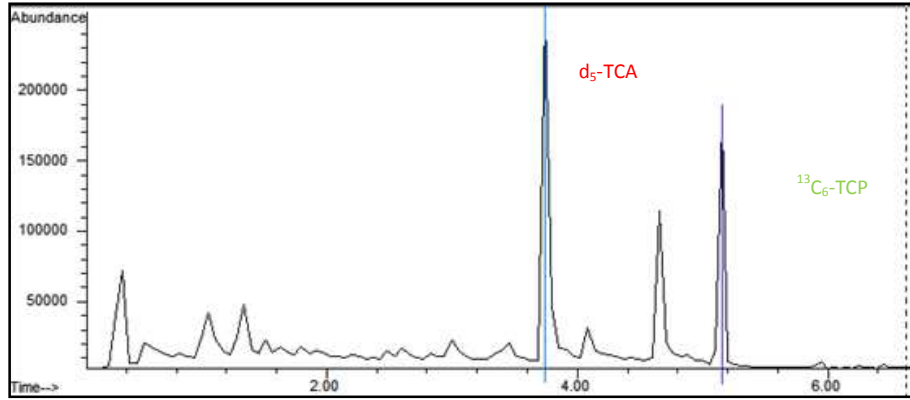


Figura 7.3. Aspecto de um espectro dos compostos D₅-TCA e ¹³C₆-TCP analisados por HS-SPME-GC-MS, em modo *scan*.

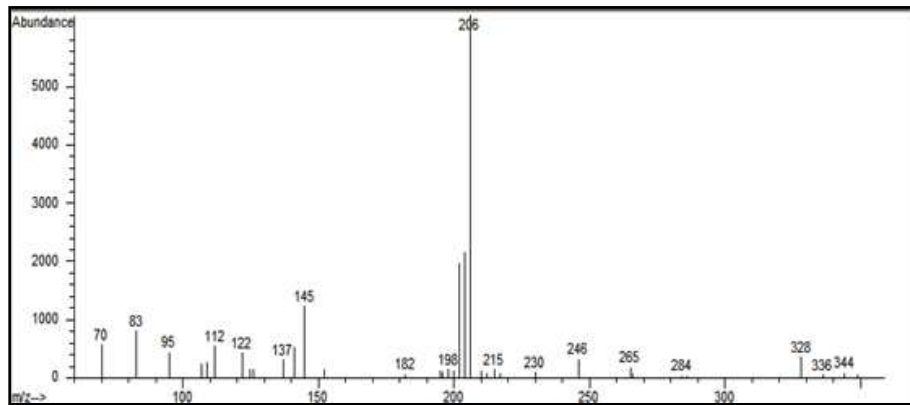


Figura 7.4. Aspecto de um cromatograma do composto D₅-TCA (ião 215) e ¹³C₆-TCP (ião 204) analisados por HS-SPME-GC-MS, em modo *scan*.

Tabela 7.1. Condições gerais do GC/MS para análise do d₅-TCA.

Temperatura do injector	270 °C
Gás de arrasto	Hélio com um caudal de 1,0 mL·min ⁻¹
Temperatura do <i>Transfer Line</i>	280 °C
Programa de temperaturas	90°C por 0 minutos, rampa de 15 °C·min ⁻¹ até 265°C mantido por 0,33 segundos, tempo total de 12 minutos
Modo de aquisição	SIM m/z: d ₅ -TCA - 215; d ₅ -TBA - 349; ¹³ C ₆ -TCP-Acetato - 204; Scan m/z: ¹³ C ₆ -TCP-Acetato - 204; d ₅ -TCA - 215

7.1.2. Preparação de amostras para análise no GC/MS

Quantificação do d₅-TCA

Amostras Líquidas – Vinho ou solução de maceração

Pipetar 10 mL da solução a analisar para vias de 20 ml com fechadura *screw-caps* munidas de um *sptum*, contendo aproximadamente 2 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido. Adicionar 100 µL de padrão interno, D5-TBA e capsular rapidamente o vial. Agitar a amostra para promover a mistura da solução com o sal e colocar a amostra no *tray* do *Combi PAL*. No GC-MS, seleccionar o método e colocar o programa a decorrer utilizando o *auto-sampler*.

Quantificação do ¹³C₆-TCP

Amostras Líquidas

- ***Solução de Maceração***

Pipetar 10 mL da solução a analisar para vias de 20 mL com fechadura *screw-caps* munidas de um *sptum*, contendo aproximadamente 2 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido. Adicionar 100 µL de padrão interno, D5-TBA e 100 µL de ácido anidrido acético, capsular rapidamente o vial. Agitar a amostra para promover a mistura da solução com o sal e colocar a amostra no *tray* do *Combi PAL*. No GC-MS, seleccionar o método e colocar o programa a decorrer utilizando o *auto-sampler* com aquecimento e agitação.

- ***Vinho***

O procedimento é igual ao anterior com a adição de 200 µL de uma solução de carbonato de potássio de concentração igual 13,8 g·L⁻¹ antes de capsular.

Amostras gasosas – Análise dos níveis de d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP atmosféricos

Abrir a tampa dos frascos de SLOM de 2 L utilizados no ensaio de contaminação atmosférica com muito cuidado para não danificar o papel de alumínio e o parafilme que vedam o frasco. De seguida, perfurar o revestimento de vedação com a seringa e posteriormente expor a fibra ao ambiente do frasco. Deixar a fibra absorver os compostos voláteis durante 20 minutos. Após 20 minutos, recolher a fibra e só depois retirar a seringa. Devido ao facto do composto $^{13}C_6$ -TCP ser menos volátil, torna-se necessário recorrer ao método de derivatização:

- Num vial de *screw-cap* (capacidade 20 ml) colocar 200 μ L de Anidrido Ácido Acético de concentração 100 μ L·(10mL)⁻¹. Injectar a seringa no vial e expor a fibra num total de 10 minutos. Retirar a fibra e só depois a seringa.

No GC-MS em “Instrument Tools” clicar em “Method” -> “Run”, em “Data File” inserir o número do ensaio e em “sample” escrever o nome que se pretende dar à análise. Clicar em “Run Method” para o método correr.

Quando o visor inferior do lado esquerdo do cromatografo começar a piscar e a luz vermelha no quadro do lado direito “*Not Ready*” desligar, injectar manualmente a seringa e carregar em “*start*”. Passados 4 minutos de estar a decorrer a análise já se pode recolher a fibra e retirar a seringa. Esperar que o programa termine (a luz vermelha do “*Not Ready*” voltar a acender) para poder retirar os resultados (ver anexo 7.2).

7.1.3. Calibração

Para se poder fazer a quantificação dos compostos em estudo utilizando a cromatografia gasosa é necessário efectuar rectas de calibração para os intervalos de concentrações de interesse. Como o cromatógrafo é um equipamento muito sensível a torna-se necessário efectuar várias rectas de calibração.

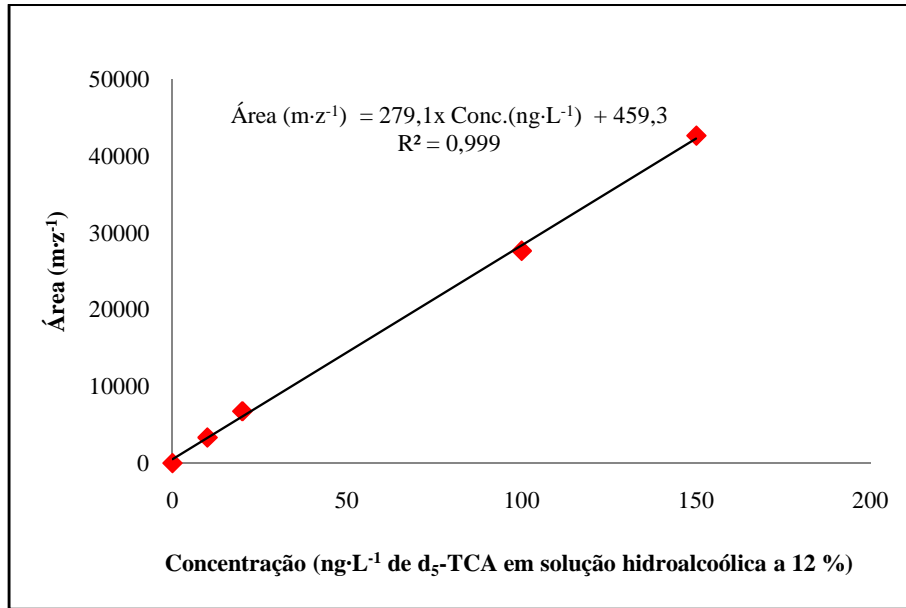


Figura 7.5. Recta de calibração para o composto d_5 -TCA [0-150] $ng \cdot L^{-1}$, com padrão interno d_5 -TBA $100 \mu g \cdot L^{-1}$.

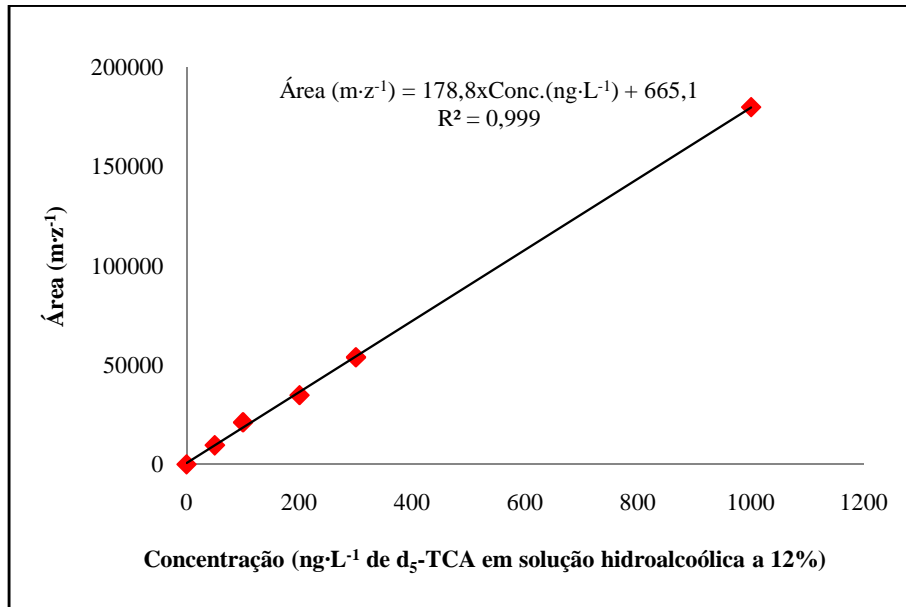


Figura 7.6. Recta de calibração para o composto d_5 -TCA [0-1000] $ng \cdot L^{-1}$, com padrão interno d_5 -TBA $100 \mu g \cdot L^{-1}$.

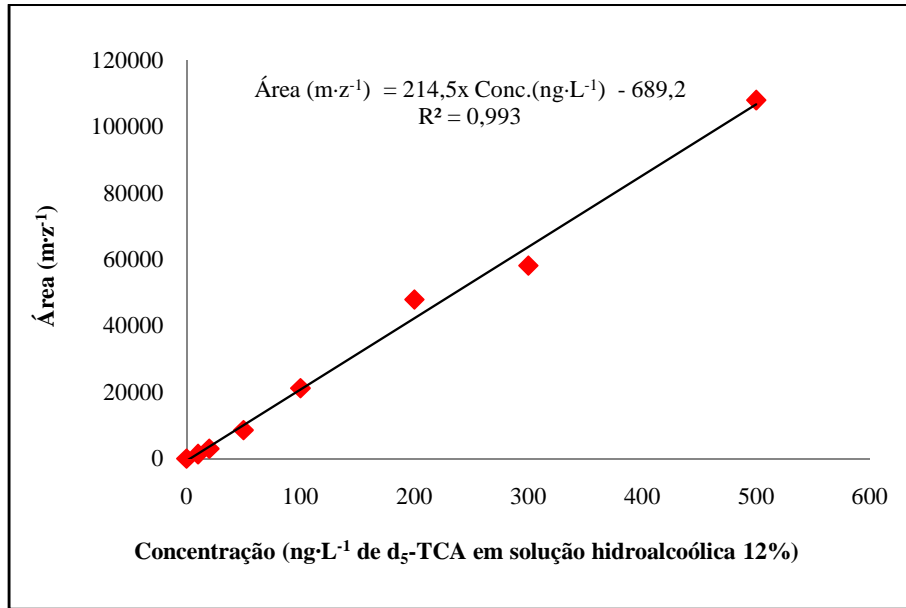


Figura 7.7. Recta de calibração para o composto d₅-TCA [0-500] ng·L⁻¹, com padrão interno d₅-TBA 100 µg·L⁻¹.

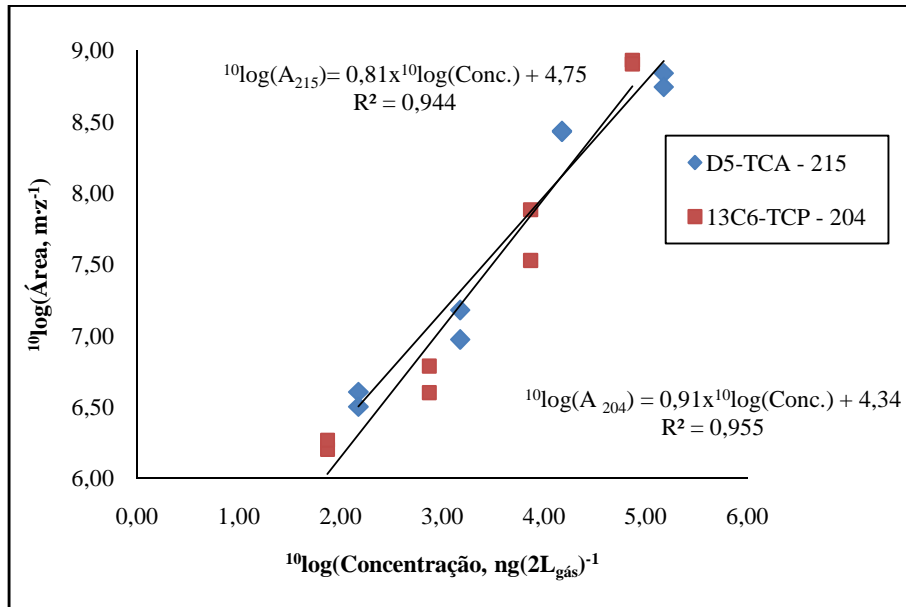


Figura 7.8. Recta de calibração para o d₅-TCA e para o ¹³C₆-TCP_{acetato} atmosféricos.

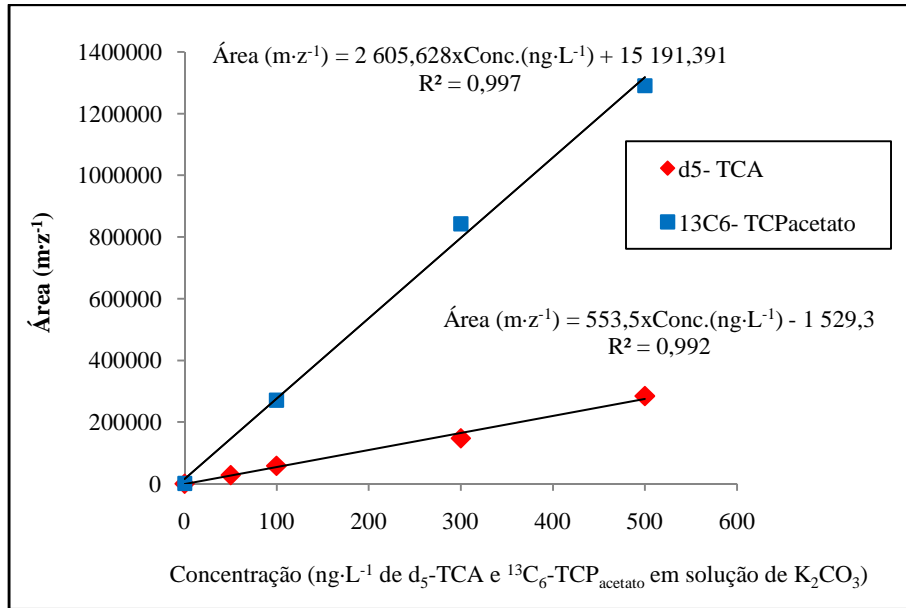


Figura 7.9. Recta de calibração para o d₅-TCA e ¹³C₆-TCP_{acetato}, [0 – 500] ng·L⁻¹.

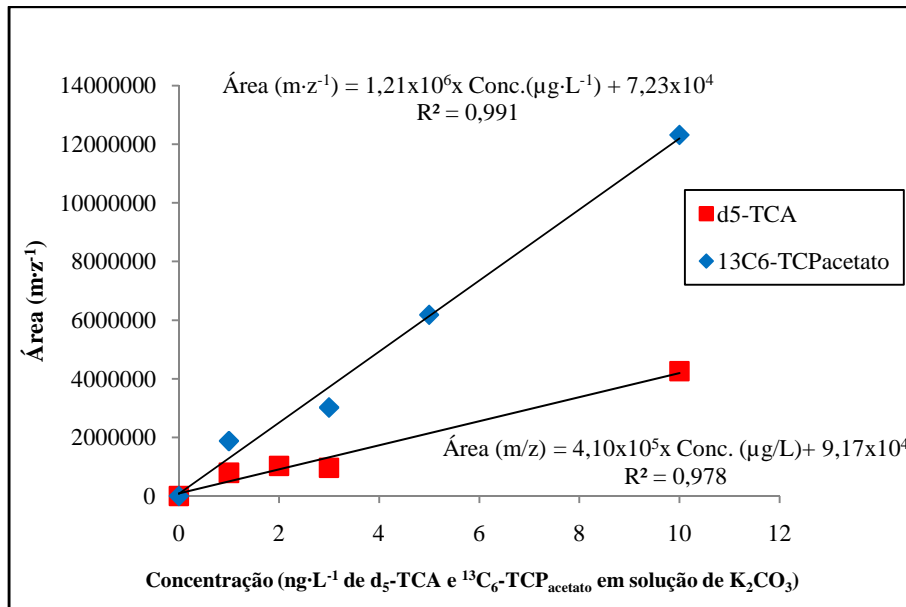


Figura 7.10. Recta de calibração para o d₅-TCA e ¹³C₆-TCP_{acetato}, [0 – 10] µg·L⁻¹.

7.2. Colocação de amostras no cromatógrafo

7.2.1. Condicionamento da coluna

- Seleccionar na barra de ferramentas inferior do computador a função “Instrument # Mstop”;
- Na nova janela seleccionar “Method”, escolher a função “C”:\MSDCHEM\1\Methods\VF5CLEAN.M”, clicar duas vezes. Se a função não existir seleccionar “Load”, “Methods”, “VF5clean” e clicar OK;
- Voltar a seleccionar a função “Method”, “Run”;
- Na janela “Start run”, escrever:
 - Data file name: C: \MSDCHEM\1\Data\ último número do ano + dia + mês +01.D ou 02.D consoante o ficheiro do dia anterior;
 - Sample name: Limpeza da coluna;
- Nesta janela seleccionar “Run Method”;
- Ver se o visor inferior do lado esquerdo do cromatógrafo fica a piscar. Quando a luz vermelha, no quadro do GC do lado direito do “Not Ready” desligar e carregar em “start” no cromatógrafo;
- O condicionamento da coluna é concluído após alguns minutos, quando a luz vermelha acender novamente em “Not Ready”.

7.2.2. Colocação das amostras no suporte do GC

- Voltar a seleccionar a função “Instrument # Mstop”, de seguida seleccionar opção;
- Na nova janela seleccionar a opção “Sequence”;
- Seleccionar “Edit sample log table” escrevendo pela ordem disposta nos respectivos suportes a listagem das amostras, da seguinte forma:
 - Type: sample;

- Vial: o número referente à posição da amostra no suporte;
 - Data files: o ficheiro para o qual os resultados são enviados tendo este a seguinte forma: último número do ano + dia + mês + um número sequencial (Ex:01;02; ... ;n);
 - Método: VF5MS;
 - Sample name: Designação da amostra
-
- Dentro da opção anterior, cada vez que se pretende adicionar uma novo amostra à listagem seleccionar no teclado “Alt + R” em simultâneo;
 - Para sair desta opção seleccionar Ok;
 - Em seguida regressar à função “Sequence” e guardar a listagem seleccionando a opção “Save”, digitando o nome da sequência da seguinte forma (RDdiamês.S.), “Ok”;
 - Regressar novamente à função “Sequence”, opção “Run” e seleccionar “Run Sequence”;
 - No painel de controlo do *Auto-Sampler* ao seleccionar a função “Insert Job” vai aparecer a palavra “Append”, confirmando no botão central do *Auto-Sampler*;
 - Dentro da função anterior escolher o suporte desejado, bem como as posições ocupadas pelos tubos no mesmo suporte e o respectivo método;
 - Para regressar ao menu principal seleccionar a função “Home” (F4);
 - No painel de controlo do MS seleccionar a função “Start” (F4).

7.2.3. Tratamento dos Resultados do GC/MS

- Seleccionar “Enhanced data analysis”;
- Seleccionar o ícone “Open” (pasta amarela aberta), clicar duas vezes sobre o ficheiro pretendido;
- Seleccionar “Cromatogram” opção “Extracted ion chromatogram”, definir os tempos de retenção 5-7 minutos, identificar os picos (1º - 349, 2º - 215) e carregar Ok;
- No livro de registos, assinalar:

- Identificação da amostra;
 - File Name;
 - Área do padrão interno;
 - Área da amostra;
- No computador seleccionar “Tools”, função “Options” colocando um visto em “Manual integration” e carregar Ok;
 - Integrar manualmente as áreas do padrão interno e da amostra;
 - Seleccionar o “pico” do padrão, correspondente ao ião 215 e aumentar a imagem do gráfico pressionando o botão esquerdo do rato;
 - Unir a base do “pico” do padrão, segundo a linha de base, pressionando o botão direito do rato;
 - Ler o resultado da área do padrão no conto inferior esquerdo e anotar o valor na lista à frente das respectivas amostra e ficheiro, no livro de registos do MS;
 - Proceder de igual forma para a área da amostra, seleccionando o “pico” da amostra, correspondente ao ião 215;
 - Os resultados vão ser transferidos do livro de registos do MS para uma folha Excel;
 - Para recalcular a área de d₅-TCA ($A_{d_5-TCA}^*$) é necessário utilizar a seguinte formula:

$$A_{d_5-TCA}^* = \frac{\overline{A_{PI}}}{A_{PI}} \times A_{d_5-TCA} \quad (7.1)$$

Legenda:

- $\overline{A_{PI}}$ – Média da área do padrão dos ponto da recta de calibração,
- A_{PI} – Valor da área do padrão interno da respectiva amostra,
- A_{d_5-TCA} – Valor da área da amostra

Para se obter o valor da concentração de d₅-TCA é necessário substituir o valor da área recalculada na equação da recta.

A recta de calibração vem dada por:

$$A_{d_5-TCA} * = m \times C_{d_5-TCA} + b \quad (7.2)$$

Logo, a concentração vem dada por:

$$C_{d_5-TCA} = \frac{A_{d_5-TCA} * - b}{m} \quad (7.3)$$

Legenda

- $A_{d_5-TCA} *$ – Área recalculada
- b – Valor da origem da recta
- m – Valor do declive da recta

7.3. Controlo do perfil do gargalo

Perfil do gargalo das garrafas utilizadas no estudo de migração do interior da rolha de cortiça natural para o vinho e no estudo de migração do exterior para o interior da garrafa através de diferentes tipos de vedantes.

Código Ensaio: 285/07

Tipo de Garrafa: Bordalesa 37.5 cL

Fornecedor: Vidrala

Profundidade: 54 mm

Dist. Topo: 3 mm

Resolução: 2mm

Tabela 7.2. Características do gargalo das garrafas utilizadas em ambos os estudos.

Prof	0 Graus	90 Graus	Média	Ovalidade	Conicidade
3,0	18,73	18,91	18,82	0,18	0,00
4,0	18,74	18,97	18,86	0,23	0,04
6,0	18,74	19,14	18,94	0,40	0,12
8,0	18,74	19,30	19,02	0,56	0,20
10,0	18,73	19,39	19,06	0,66	0,24
12,0	18,74	19,45	19,10	0,71	0,28
14,0	18,89	19,60	19,25	0,71	0,43
16,0	19,48	20,07	19,78	0,59	0,96
18,0	20,24	20,77	20,51	0,53	1,69
20,0	20,73	21,29	21,01	0,56	2,19
22,0	20,86	21,39	21,13	0,53	2,31
24,0	20,87	21,39	21,13	0,52	2,31
26,0	20,88	21,39	21,14	0,51	2,32
28,0	20,91	21,38	21,15	0,47	2,33
30,0	20,95	21,35	21,15	0,40	2,33
32,0	20,98	21,32	21,15	0,34	2,33
34,0	20,99	21,30	21,15	0,31	2,33
36,0	21,01	21,30	21,16	0,29	2,34
38,0	21,03	21,30	21,17	0,27	2,35
40,0	21,09	21,30	21,20	0,21	2,38
42,0	21,19	21,30	21,25	0,11	2,43
44,0	21,36	21,32	21,34	0,04	2,52
46,0	21,60	21,35	21,48	0,25	2,66
48,0	21,93	21,45	21,69	0,48	2,87
50,0	22,35	21,64	22,00	0,71	3,18
52,0	22,88	21,94	22,41	0,94	3,59
54,0	23,53	22,37	22,95	1,16	4,13

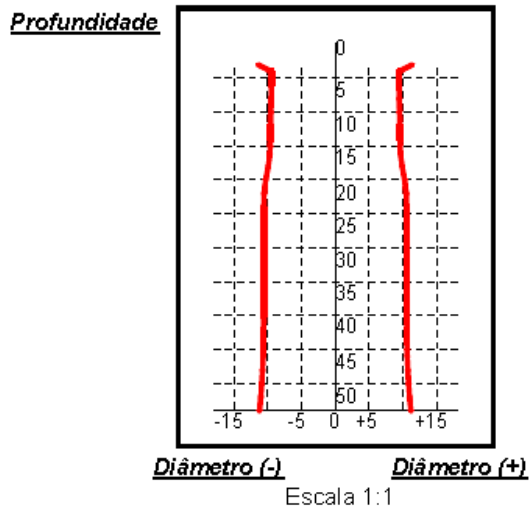


Figura 7.11. Esquema do perfil do gargalo em termos de profundidade.

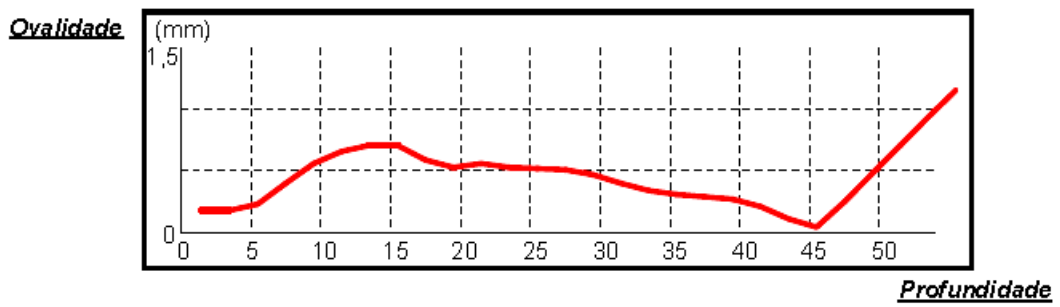


Figura 7.12. Esquema do perfil do gargalo em termos de ovalidade.

7.4. Propriedades das rolhas utilizadas no estudo de contaminação atmosférica

Tabela 7.3. Propriedades físicas das rolhas naturais 38 mm x 24 mm, qualidade superior.

Rolhas Naturais								
Rolha	Comp.	Diam. 1	Diam. 2	D.médio	Ovalidade	Massa	Massa Vol. aparente	Humidade
1	37,94	24,06	24,05	24,06	0,01	2,85	165,2214	4,4
2	38,21	24,16	24,15	24,16	0,01	2,69	153,5647	4,1
3	38,08	24,12	24,13	24,13	0,01	3,20	183,7589	4,2
5	37,90	23,99	24,02	24,01	0,03	2,81	163,7543	4,6
6	37,83	24,01	23,88	23,95	0,13	2,80	164,2936	4,6
7	37,91	23,93	23,90	23,92	0,03	2,93	171,9893	4,2
9	38,03	24,26	24,23	24,25	0,03	2,87	163,3962	4,3
10	38,10	24,26	24,18	24,22	0,08	2,85	162,361	4,3
11	37,96	24,18	24,16	24,17	0,02	2,65	152,1515	4,1
13	38,06	23,93	23,92	23,93	0,01	3,17	185,189	4,4
15	37,77	23,95	23,96	23,96	0,01	2,72	159,7196	3,9
17	38,16	23,87	24,09	23,98	0,22	2,64	153,1818	4,3
19	37,92	24,15	24,08	24,12	0,07	2,95	170,2586	4,3
20	38,16	23,92	23,77	23,85	0,15	2,30	134,9126	4,6
21	37,66	23,89	23,69	23,79	0,20	2,55	152,3285	4,2
22	37,86	23,45	23,85	23,65	0,40	3,00	180,38	4,2
23	37,91	23,83	23,92	23,88	0,09	2,63	154,8971	4,5
24	38,00	24,01	24,08	24,05	0,07	2,70	156,4083	4,5
25	38,08	24,13	24,08	24,11	0,05	3,07	176,5862	4,5
26	37,76	24,10	23,84	23,97	0,26	2,66	156,1074	4,2
27	37,89	24,16	24,09	24,13	0,07	3,23	186,4117	4,5
28	37,75	23,82	23,60	23,71	0,22	3,42	205,1899	3,9
29	37,83	23,70	23,34	23,52	0,36	2,64	160,6212	3,9
30	38,07	24,00	23,86	23,93	0,14	2,53	147,7617	4,2
31	37,99	24,04	24,10	24,07	0,06	2,85	164,8668	4,2
32	38,05	24,29	24,25	24,27	0,04	2,83	160,7689	4,2
33	38,01	23,94	23,87	23,91	0,07	3,20	187,5007	4,3
35	38,17	23,94	23,87	23,91	0,07	2,72	158,7075	4,6
38	38,07	24,05	24,06	24,06	0,01	2,91	168,1236	4,3
40	38,23	23,97	24,05	24,01	0,08	2,97	171,5844	4,6

Tabela 7.4. Propriedades físicas das rolhas técnicas Neutrocork 38 mm x 24 mm.

Rolhas Neutrocork								
Rolha	Comp.	Diam. 1	Diam. 2	D.médio	Ovalidade	Massa	Massa Vol. Aparente	Humidade
1	37,69	23,93	23,91	23,92	0,02	5,06	298,7528	7
2	37,56	23,88	23,82	25,85	0,06	4,88	290,8222	7,2
3	37,72	23,87	23,82	23,85	0,05	4,91	291,3688	6,7
4	37,65	23,9	23,88	23,89	0,02	5,02	297,4517	6,7
6	37,63	23,89	23,86	23,88	0,03	5,14	304,9792	7,3
7	37,59	23,9	23,82	23,86	0,08	4,98	296,2962	6,7
8	37,4	23,71	23,73	23,72	0,02	4,61	278,9394	6,8
9	37,65	23,88	23,82	23,85	0,06	4,97	295,4776	6,8
12	37,8	23,87	23,86	23,87	0,01	5,07	299,7239	6,8
13	37,59	23,82	23,77	23,80	0,05	4,76	284,6366	6,8
14	37,54	23,83	23,79	23,81	0,04	4,71	281,785	6,6
15	37,68	23,89	23,92	23,91	0,03	4,88	288,4429	6,4
16	37,55	23,87	23,84	23,86	0,03	4,79	285,2954	6,9
17	37,61	23,84	23,82	23,83	0,02	4,9	292,1155	7
19	37,63	23,79	23,75	23,77	0,04	4,86	291,047	6,9
21	37,49	23,76	23,71	23,74	0,05	4,69	282,622	7
23	36,5	23,75	23,73	23,74	0,02	4,79	288,5711	6,9
24	37,54	23,86	23,79	23,83	0,07	4,79	286,0903	6,8
26	37,86	23,95	23,9	23,93	0,05	5,22	306,5593	6,3
27	37,47	23,75	23,72	23,74	0,03	4,74	285,7875	6,6
28	37,44	23,81	23,74	23,78	0,07	4,78	287,4607	7,2
29	37,61	23,83	23,79	23,81	0,04	4,85	289,6207	6,7
30	37,65	23,85	23,85	23,85	0	4,96	294,8832	6,6
31	37,61	23,86	23,86	23,86	0	4,98	296,1387	6,7
32	37,65	23,91	23,89	23,90	0,02	4,82	285,3621	6,9
33	37,62	23,85	23,82	23,84	0,03	4,93	293,5795	7,1
35	37,62	23,84	23,85	23,85	0,01	4,74	282,0284	6,5
37	37,45	23,79	23,72	23,76	0,07	4,7	283,0501	6,5
38	37,67	23,83	23,87	23,85	0,04	4,86	288,7845	6,4
39	37,5	23,85	23,8	23,83	0,05	4,79	286,3955	6,8

Tabela 7.5. Propriedades físicas dos vedantes sintéticos Nomacorc *Classic* 37 mm x 24 mm.

Rolhas Nomacorc							
Rolha	Comp.	Diam. 1	Diam. 2	D.médio	Ovalidade	Massa	Massa Vol. Aparente
1	36,97	22,07	22,11	22,09	0,04	5,27	371,9459
3	36,99	21,8	21,86	21,83	0,06	5,3	382,8196
4	37,05	22,2	22,24	22,22	0,04	5,33	370,9889
5	36,76	22,13	22,1	22,12	0,03	5,45	385,7987
6	36,83	21,94	21,96	21,95	0,02	5,3	380,2902
7	37,47	21,99	21,74	21,87	0,25	5,38	382,218
8	37,02	21,98	21,92	21,95	0,06	5,29	377,6245
9	36,99	22,06	21,98	22,02	0,08	5,3	376,2418
10	36,87	22,05	22,14	22,10	0,09	5,34	377,5666
11	37,04	22,03	22,08	22,06	0,05	5,33	376,4916
12	36,92	22,08	21,97	22,03	0,11	5,31	377,3235
13	36,74	22,07	21,96	22,02	0,11	5,35	382,3755
14	36,98	21,82	21,8	21,81	0,02	5,28	382,178
15	36,92	22,09	22,03	22,06	0,06	5,32	377,0066
19	36,87	21,91	21,96	21,94	0,05	5,27	378,0718
21	36,94	22,03	21,91	21,97	0,12	5,28	377,0396
22	37,01	22,03	22,04	22,04	0,01	5,32	376,7727
23	36,89	21,88	21,84	21,86	0,04	5,27	380,6376
24	36,88	22,05	22,04	22,05	0,01	5,47	388,409
25	36,92	22,01	22,11	22,06	0,1	5,31	376,2979
26	36,91	21,91	21,91	21,91	0	5,27	378,697
28	36,78	22,2	22,03	22,12	0,17	5,43	384,1739
29	37,04	22,09	22,16	22,13	0,07	5,35	375,5173
30	36,93	21,92	21,83	21,88	0,09	5,3	381,691
33	37,05	21,97	21,98	21,98	0,01	5,35	380,5574
34	37,08	22	22,02	22,01	0,02	5,26	372,8345
36	36,94	22,12	21,98	22,05	0,14	5,57	394,8672
38	36,83	22,06	22,03	22,05	0,03	5,53	393,2025
39	36,97	22,05	21,96	22,01	0,09	5,45	387,4512
40	36,84	22,11	21,9	22,01	0,21	5,52	393,8125