

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## Migração de $d_5$ -TCA através de vedantes em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho

Tese de Mestrado

Desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial

José Mário de Almeida Lino

Amorim & Irmãos, S.A. - Investigação & Desenvolvimento



Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: Prof. Adélio Mendes

Orientador na empresa: Prof. Miguel Cabral

Julho de 2008

---



## Agradecimentos

Na qualidade de orientando, desejo expressar, em primeiro lugar, ao Professor Doutor Miguel Cabral e ao Professor Doutor Adélio Mendes, o meu agradecimento pela oportunidade e condições de trabalho concedidas.

A toda a equipa do departamento I & D da Amorim & Irmãos, desejo agradecer de uma forma especial por todo o auxílio prestado ao longo do estágio, pela boa disposição e integração.

Agradeço também aos meus pais e irmãos por todo o apoio e compreensão ao longo destes meses.

---

## Resumo

“Aroma a rolha” em vinhos tem sido considerado como o maior problema associado com o uso de rolhas de cortiça. Este problema surge devido à contaminação dos vinhos por cloroanisóis, especialmente o 2,4,6 – Tricloroanisol (TCA), não sendo exclusivo da cortiça.

Foram contaminadas artificialmente o interior de rolhas naturais de forma a estudar a migração de d<sub>5</sub>-TCA para o vinho engarrafado. Após 4 meses verificou-se que o d<sub>5</sub>-TCA adicionado não tinha migrado para o vinho. Contudo, o interior das rolhas, continuava contaminado.

Foi analisada a migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosféricos para uma solução hidroalcoólica vedada com rolhas de cortiça natural, Neutrocork e vedantes sintéticos Nomacorc Classic. Foram introduzidas 90 garrafas numa câmara com aqueles contaminantes e analisadas 15 após 6 meses de conservação. Foi observado que o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP migraram através dos vedantes Nomacorc para a solução hidroalcoólica. Por outro lado, as rolhas de cortiça constituíram uma protecção eficaz à migração dos contaminantes para a solução engarrafada.

De forma a desenvolver um método que permita envelhecer um vinho de forma acelerada, submeteu-se um mesmo vinho vedado com rolhas de cortiça natural, técnica (Neutrocork) e cápsulas de rosca, conservado a diferentes temperaturas. Após 6 meses de engarrafamento, o vinho conservado a temperaturas mais elevadas apresentou uma evolução mais marcada (redução do SO<sub>2</sub> total, maior absorvância a 420 nm e menor concentração de ésteres e acetato de etilo) independentemente da do tipo de vedante utilizado.

A avaliação do efeito barreira do tratamento Acquamark foi realizada em rolhas naturais provenientes de um mesmo lote de rolhas contaminado com TCA. Após 24 horas de conservação, o tratamento Acquamark não constituiu uma barreira efectiva à migração de 2,4,6-TCA das rolhas naturais para as soluções hidroalcoólicas.

Palavras-chave: d<sub>5</sub>-TCA, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, vinho, cortiça, Nomacorc, Neutrocork, rosca, migração, Acquamark.

---

## Abstract

Cork taint has been the major problem associated to wine contamination, which could result of the migration of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) from cork stoppers to wine.

In order to study this phenomenon, deuterium-labeled trichloroanisole (d<sub>5</sub>-TCA) was injected in natural cork stoppers. After 4 months of storage d<sub>5</sub>-TCA didn't migrate to wine. However, cork stoppers were still contaminated.

The migration of exogenous d<sub>5</sub>-TCA and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP through natural cork stoppers, Neutrocork and synthetic closures was assessed by exposing an hydroalcoholic bottled solution to a contaminated atmosphere. After 6 months storage, d<sub>5</sub>-TCA and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP migrated throughout the synthetic closure to the hydroalcoholic solution. On the other hand, cork closures displayed an effective barrier to the transmission of exogenous taints.

The impact of the temperature on chemical and sensory properties of the bottled wine was assessed. After 6 months, the wine bottles stored under highest temperatures showed higher DO420 nm absorption, lower SO<sub>2</sub> concentration and lower esters and ethyl acetate content than the normal storage, irrespectively the type of closures.

A batch of contaminated cork stoppers was used to assess the effect of the Acquamark treatment on the migration of 2,4,6-TCA. After 24 hours of treatment, the results showed that Acquamark is ineffective barrier against the migration of 2,4,6-TCA.

Keywords: d<sub>5</sub>-TCA, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, wine, cork, Nomacor, Neutrocork, screw-caps, migration, Acquamark.

---

# Índice

Notação e Glossário .....	iii
1 Introdução.....	1
1.1 A rolha como vedante de garrafas .....	1
1.1.1 Impacto ao nível sensorial, TCA, haloanisóis .....	1
1.1.2 Impacto do oxigénio no desenvolvimento do vinho .....	3
1.2 Objectivos do trabalho .....	4
1.3 Contributos do trabalho .....	4
1.4 Organização da tese .....	5
2 Estado da Arte .....	6
2.1 Cloroanisóis enquanto contaminantes de vinhos .....	6
2.2 O papel do oxigénio na evolução do vinho .....	7
3 Estudo da migração de d <sub>5</sub> -TCA do interior da rolha natural para o vinho.....	9
3.1 Metodologia .....	9
3.1.1 Contaminação do interior das rolhas de cortiça natural .....	9
3.1.2 Engarraçamento .....	9
3.1.3 Análise de d <sub>5</sub> -TCA no vinho, na superfície e no interior das rolhas .....	11
3.1.4 Tratamento Estatístico dos dados.....	11
3.2 Resultados .....	11
4 Estudo da migração de d <sub>5</sub> -TCA e <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -TCP atmosférico para o interior de uma garrafa de vinho .....	14
4.1 Metodologia .....	14
4.1.1 Contaminação atmosférica .....	14
4.1.2 Engarraçamento .....	14
4.1.3 Análise de d <sub>5</sub> -TCA e <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -TCP na atmosfera nas rolhas e na solução hidroalcoólica .....	15
4.2 Resultados .....	16
5 Estudo do desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho .....	21
5.1 Metodologia .....	21

5.1.1	Parâmetros dos ensaios .....	21
5.1.2	Engarrafamento .....	21
5.1.3	Análise das rolhas .....	22
5.1.4	Análise da cor .....	22
5.1.5	Análise de dióxido de enxofre e ácido ascórbico .....	22
5.1.6	Caracterização aromática do vinho por cromatografia gasosa .....	23
5.1.7	Análise sensorial.....	23
5.1.8	Tratamento estatístico dos dados.....	23
5.2	Resultados .....	24
5.2.1	Composição química do vinho ao ponto zero .....	24
5.2.2	Análise ao fim de 6 meses de conservação .....	26
5.2.2.1	Análise às rolhas .....	26
5.2.2.2	Análise Química.....	27
5.2.2.3	Caracterização aromática .....	29
5.2.2.4	Análise sensorial .....	32
6	Estudo do efeito barreira do Acquamark à passagem do 2,4,6-TCA de rolhas naturais para soluções hidroalcoólicas .....	34
6.1	Metodologia .....	34
6.1.1	Análise de 2,4,6-TCA na solução hidroalcoólica .....	36
6.1.2	Tratamento estatístico dos dados.....	36
6.2	Resultados .....	36
7	Conclusões .....	39
8	Avaliação do trabalho realizado.....	40
8.1	Objectivos realizados .....	40
8.2	Outros trabalhos realizados.....	40
8.3	Limitações e trabalho futuro .....	40
8.4	Apreciação final .....	41
	Referências .....	42
9	Anexos .....	45

## Notação e Glossário

### Lista de siglas

2,4,6-TCA	2,4,6-tricloroanisol	
2,3,4,6-TeCA	2,3,4,6-tetracloroanisol	
PCA6	Pentacloroanisol	
2,4,6-TBA	2,4,6-tribromoanisol	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -TCP	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -triclorofenol	
d <sub>5</sub> -TCA	Deutério-tricloroanisol	
d <sub>5</sub> -TBA	Deutério-tribromoanisol	
SPME	Microextração em fase sólida	
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectros de Massa	
CVRVV	Comissão de Viticultura da região dos Vinhos Verdes	
ANOVA	Análise de Variância	
I & D	Departamento de Investigação e Desenvolvimento	
MIEQ	Mestrado Integrado em Engenharia Química	
A	Área do pico	m.z <sup>-1</sup>
C	Concentração	ng.L <sup>-1</sup>
M	Massa Molar	g.mol <sup>-1</sup>
P	Valor de prova	
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação	
t <sub>ret</sub>	Tempo de retenção	min
T	Temperatura	°C
V	Volume	L
p.i.	Padrão interno	

# 1 Introdução

A principal função de uma rolha é a vedação da garrafa. A rolha deve ser a mais neutra possível e estanque à passagem do líquido contido na garrafa. A permeabilidade relativa ao ar poderá ser vantajosa, se desejar promover a maturação do vinho, ou, pelo contrário, prejudicial, se o envelhecimento do vinho também o for (Fortes et al., 2006).

## 1.1 A rolha como vedante de garrafas

### 1.1.1 Impacto ao nível sensorial, TCA, haloanisóis

“Aroma a rolha” em vinhos tem sido considerado como o maior problema associado com o uso de rolhas de cortiça. Este problema surge devido à contaminação dos vinhos por cloroanisóis, especialmente o 2,4,6 – tricloroanisol (TCA), não sendo exclusivo da cortiça. TCA caracteriza-se por produzir um aroma desagradável definido como mofo ou bafio.

O TCA pode gerar-se por diferentes vias metabólicas, no entanto, a formação de TCA a partir de TCP por reacções de biometilação é a única origem cientificamente comprovada. Esta reacção de biometilação é realizada por diferentes famílias de fungos filamentosos (*Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Cephalosporium* spp., ...) que crescem quer nas pranchas de cortiça, quer nos materiais de madeira existentes nas caves (Alvarez-Rodriguez et al., 2002). Esta reacção é catalisada pela clorofenol O-metiltransferase (Coque et al., 2003).


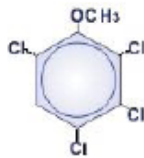
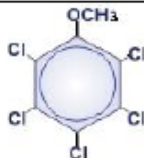

O TCA é uma substância quimicamente estável que não se degrada significativamente no vinho. Estudos recentes comprovam que só quando a superfície contaminada da rolha entra em contacto directo, ou em relativa proximidade, com o vinho (ou headspace acima do vinho) se dá a transferência de TCA entre a rolha e o vinho. Consequentemente, a localização do TCA na rolha e a orientação da rolha durante o engarrafamento são parâmetros fundamentais que contribuem para a contaminação ou não do vinho (Pollnitz et al., 1996; Capone et al., 1999 e 2002).

Apesar da boa correlação existente entre o nível de percepção sensorial e a concentração de TCA, existem alguns vinhos que apresentam fortes aromas a “fúngicos”, “mofo” e “bafio”, mas baixas concentrações de TCA, o que indica que outros componentes contribuem para estes desvios sensoriais (Simpson et al., 2005). Recentemente, outras moléculas, além do TCA, foram identificadas como a causa dos aromas e gostos fúngicos, contudo e ao contrário do TCA detectado no vinho que tem a sua origem associada à rolha de cortiça, estes têm a sua origem mais associada às caves que por si só já se encontram contaminadas, tais como, barricas e seus suportes em madeira, paredes e tectos interiores, traves e paletes em madeira, escadas, cartões, água da torneira, tubos, filtros, estabilizadores e os revestimentos poliméricos dos tanques (Coque et al., 2006):

- 2-metoxi-3,5 dimetilpirazina foi identificada como um potente odor a mofo. A sua contribuição para o limiar de detecção no vinho ainda não foi comprovada, no entanto, para os vinhos australianos, é depois do TCA, a segunda causa mais importante de contaminação (Simpson et al., 2005);
- 2,4,6 – Tribromoanisol (2,4,6 – TBA), responsável por um gosto e aromas a mofo semelhante ao produzido pelo TCA (Chatonnet et al., 2004);
- 2,3,4,6 – Tetracloroanisol (2,3,4,6 – TeCA), responsável por um odor desagradável detectado num conjunto de frangos de um restaurante (Curtis et al., 1974);
- Pentacloroanisol (PCA), responsável pelo aparecimento de um odor a mofo em polpa de madeira armazenada (Cserjesi e Johnson., 1972);

De uma maneira geral, estes compostos são muito voláteis, sendo facilmente transmitidos através do ar e demonstram uma grande capacidade para aderir e contaminar a madeira, cortiça e muitos outros materiais (plásticos, silicone, cartão e papel, borracha, etc.), além de possuírem um limiar de percepção olfativo muito baixo em solução alcoólica.

Tabela 1.1: Limiares de percepção dos principais cloroanisóis e bromoanisóis envolvidos, na contaminação de vinhos (adaptado de Coque et al., 2006)

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

### 1.1.2 Impacto do oxigénio no desenvolvimento do vinho

O papel do oxigénio no desenvolvimento do vinho durante o envelhecimento em garrafa não está totalmente compreendido. O vedante é a variável mais óbvia que poderá influenciar o desenvolvimento do vinho em garrafa, mas não deixa de ser apenas um factor (Godden et al., 2005). Outros factores determinantes para “oxigenação” dos vinhos são: as condições de vinificação, condições da linha de engarrafamento, o volume do headspace e a composição do gás, condições de armazenamento, e a composição do próprio vinho.

O contacto entre o vinho e oxigénio é um factor crítico durante o processo de vinificação e envelhecimento em barricas/cubas e garrafa. A entrada de oxigénio na garrafa é extremamente dependente do vedante utilizado (Godden et al., 2005). Esta entrada é muito mais importante durante o engarrafamento e o primeiro mês do que nos meses seguintes de armazenamento. Para rolhas de cortiça natural, a taxa de entrada de oxigénio segue um declínio gradual durante o primeiro ano (2-6  $\mu\text{L}/\text{dia}$ ), tornando-se muito reduzida nos 24 meses seguintes (0,1-2  $\mu\text{L}/\text{dia}$ ). As cápsulas de rosca e rolhas de cortiça técnica apresentam um nível de permeabilidade de oxigénio durante a armazenagem consistentemente baixo (menos de 1  $\mu\text{L}/\text{dia}$ ). Em contrapartida, vedantes sintéticos, Nomacorc e Supremecorc, continuam a apresentar as mais elevadas taxas de permeabilidade ao oxigénio, 6 e 13  $\mu\text{L}/\text{dia}$ , respectivamente (Lopes et al., 2007).

Por tudo isto, vinho engarrafado com vedantes sintéticos apresenta uma tendência a oxidar rapidamente (Godden et al., 2001; Chatonnet et al., 2004; Francis et al., 2003; Skouroumounis et al., 2005). Em contrapartida, a pouca oxigenação do vinho provoca a presença de aromas indesejáveis, tais como a “pedra de isqueiro e/ou borracha”, características de um vinho que sofreu redução, por norma associados a vinhos vedados com cápsulas de rosca (Godden et al., 2005; Francis et al., 2003; Skouroumounis et al., 2005). Vinho vedado com rolhas de cortiça natural sofre uma evolução mais normalizada, sem no entanto apresentar problemas com o oxigénio (Francis et al., 2003).

No caso do vinho tinto algum grau de oxigenação pode ser benéfico para o seu desenvolvimento em garrafa, actuando como elemento estabilizador da cor e das propriedades organolépticas. Por outro lado, a qualidade dos vinhos brancos é normalmente prejudicada pela exposição ao ar devido a alterações nas qualidades sensoriais e cromáticas (Godden et al., 2001). O oxigénio desnatura o aroma, destrói o frutado, escurece a cor. A oxidação das substâncias fenólicas provoca modificações intensas da cor (nos casos extremos é a classe oxidásica), e a formação de substâncias acres e amargas.

Os vinhos, sobretudo os brancos, são protegidos contra a oxidação e deterioração microbiana, por meio da adição de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ). O  $\text{SO}_2$  desempenha um papel de anti-oxidante irreversível captando para si oxigénio dissolvido, mas sobretudo produtos resultantes das reacções de oxidação do vinho: acetaldeído e peróxido de hidrogénio. O ácido ascórbico, ou vitamina C, fixa rapidamente o oxigénio dissolvido transformando-se em ácido deshidroascórbico e formando peróxido de hidrogénio (poderoso oxidante). Devido a este

facto, o ácido ascórbico só exerce plenamente as suas propriedades de anti-oxidante quando associado com SO<sub>2</sub> (Peynaud., 1993).

Após o engarrafamento, os vinhos entram num ciclo de envelhecimento, em que as principais características são notórias tanto ao nível sensorial como cromático. Durante este período, os compostos aromáticos do vinho vão evoluindo aromas mais finos; conjugado com uma diminuição tanto do SO<sub>2</sub> livre e total e do ácido ascórbico; um aumento da intensidade da cor (A<sub>420</sub>). No caso do vinho branco, uma evolução de um tom amarelo para um tom mais acastanhado e no vinho tinto, uma evolução de um tom encarnado para um tom alaranjado.

## 1.2 Objectivos do trabalho

Este projecto teve como principais objectivos: o estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho; o estudo da capacidade de vedação perante a migração de compostos atmosféricos (d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP) através de diferentes tipos de vedantes; desenvolvimento de um método que relacionasse a evolução normal de um vinho com a evolução condicionada, aumentando a temperatura, através de diferentes tipos de vedantes; estudo do efeito barreira do Acquamark em rolhas de cortiça à passagem do TCA.

## 1.3 Contributos do trabalho

Para a indústria corticeira, é essencial saber de que forma se poderá diminuir a contaminação por TCA.

Foi estudada a capacidade de retenção de TCA nas rolhas de cortiça natural contaminadas no seu interior e de não deixar migrar para o vinho em contacto. Pretendeu-se também clarificar o efeito barreira que diferentes tipos de vedantes apresentam face a um ambiente contaminado com TCA, percebendo se o designado "aroma a rolha" é da exclusiva responsabilidade das rolhas de cortiça natural.

Desenvolver um método expedito que permita ao departamento I&D da Amorim & Irmãos uma validação mais rápida dos seus produtos.

Avaliar até que ponto o teste de tratamento Acquamark faz barreira à migração de TCA das rolhas para as soluções hidroalcoólicas.

#### 1.4 Organização da tese

Esta tese está dividida em oito capítulos.

O primeiro, a introdução, enquadra o leitor no trabalho apresentado, fornecendo conceitos sobre a importância do vedante tanto na prevenção de contaminações para o vinho por parte dos haloanisóis como no desenvolvimento do próprio vinho em garrafa. Enquadra também o leitor sobre os principais objectivos subjacentes à presente investigação.

No segundo, o estado da arte, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre estudos relacionados e que conduziram à necessidade da presente investigação.

No terceiro, encontra-se apresentada a metodologia e os resultados referentes ao segundo e terceiro pontos de análise do estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA do interior da rolha natural para o vinho.

No quarto, encontra-se apresentada a metodologia e os resultados referentes ao segundo e terceiro pontos de análise do estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosférico para o interior de uma garrafa de vinho.

No quinto, encontra-se apresentada a metodologia e os resultados referentes ao segundo ponto de análise do estudo do desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho.

No sexto, encontra-se apresentada a metodologia e os resultados referentes ao primeiro ponto de análise do estudo do efeito barreira ao Acquamark à passagem do 2,4,6-TCA.

No sétimo, encontra-se apresentada as conclusões mais importantes relativas aos quatro estudos desenvolvidos na presente investigação.

No oitavo e último capítulo, encontra-se apresentada a avaliação de todo o trabalho desenvolvido.

## 2 Estado da Arte

### 2.1 Cloroanísóis enquanto contaminantes de vinhos

“Aroma a rolha” no vinho é um dos mais sérios problemas com que se confronta a moderna indústria vinícola (Amon e Simpson., 1986, Simpson., 1989). As estimativas da proporção de garrafas afectadas variam entre 1-5 %, podendo ocasionalmente ser superior a 30 % (Sefton et al., 2005). Contudo, estas estimativas são baseadas em resultados de análise sensorial de provadores com diferentes experiências e não de análise química, carecendo portanto de comprovação científica acerca da fonte de contaminação dos vinhos (Pollnitz et al., 1996, Capone et al., 1999).

Numa amostra de vinhos comerciais presentes a uma avaliação, 18 das 374 garrafas em estudo (4,8%) foram identificadas, por 20% dos provadores, como estando contaminadas por aromas a “mofo”. Posteriormente, essas 18 garrafas foram sujeitas a análises químicas e foi detectada uma concentração igual ou superior a 1 ng/L de 2,4,6-TCA (Pollnitz et al., 1996). Peña-Neira et al., (2000) confirmaram a presença de 2,4,6-TCA, em concentrações superiores a 4 ng/L, em 80% das 46 amostras de vinho que apresentavam aromas a “mofo” na análise sensorial. Soleas et al., (2002) analisaram 2400 vinhos comerciais de vários países. Em 145 desses vinhos (6%) foram detectados aromas fúngicos, mofo e bafio. Contudo, na análise por GC-MS apenas 71 vinhos (49%) apresentavam níveis de TCA mais elevados que o limiar de percepção de 2 ng/L, e em 35% dos vinhos analisados não foi detectado TCA.

Estima-se que cerca de 80-85% dos aromas “fúngicos”, “mofo” e “bafio” são atribuídos ao TCA (Sefton et al., 2005). Contudo, o vinho pode ser contaminado por TCA ou outros haloanísóis ainda antes de ser engarrafado, se contactar com materiais contaminados (ex. barris de carvalho) e/ou em caves que possuam uma atmosfera contaminada (Chatonnet et al., 2004, Capone et al., 1999).

A cortiça, assim como a madeira e os plásticos, podem absorver cloroanísóis por via aérea, mesmo sem um contacto físico directo com a fonte primária de contaminação (Barker et al., 2001). No caso de rolhas de cortiça e vedantes sintéticos armazenados em ambientes contaminados tal pode-se traduzir numa absorção de cloroanísóis que depois serão susceptíveis de serem transmitidos ao vinho durante a conservação em garrafa.

As razões que contribuem para a presença e acumulação de TCA e outros haloanísóis na cortiça têm sido revistas por vários autores, mas ainda não são totalmente compreendidas (Pollnitz et al., 1996, Capone et al., 2002). Capone et al., (2002) descreveram uma experiência em que se adicionou d<sub>5</sub>-TCA à superfície externa de 48 rolhas engarrafadas, com o objectivo de analisar se o TCA proveniente de fontes externas consegue migrar pela rolha de cortiça natural e atingir o vinho. Este estudo mostrou que o TCA não migra através da rolha de cortiça, não contaminando o vinho durante 36 meses de conservação. Na maioria das rolhas, 90 % do d<sub>5</sub>-TCA ficava absorvido no primeiro terço da rolha. Contudo, não existem estudos sobre a

migração de compostos atmosféricos através de outros tipos de vedantes como rolhas técnicas de cortiça, cápsulas de rosca e vedantes sintéticos.

A lenta migração de TCA ao longo do comprimento da rolha de cortiça suporta o argumento de que só quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto directo com o vinho (ou headspace acima do vinho), se dá a transferência dos cloroanisóis a partir da cortiça para o vinho (Amon e Simpson., 1986, Capone et al., 1999). Contudo, não está claro se o TCA contido no interior da rolha de cortiça natural consegue migrar para o vinho.

Recentemente, foi relatado que a principal fonte de oxigenação do vinho em garrafas vedadas com rolhas de cortiça (natural e técnica) é a própria estrutura da rolha. Jean Ribéreau-Gayon (1933) foi o primeiro a reportar a permeabilidade da rolha de cortiça natural: 0,10 – 0,38 mL de oxigénio nas primeiras três semanas e entre 0 – 0,07 mL nos quatro meses seguintes. A entrada de oxigénio pela interface cortiça-vidro é residual e apenas observada nas garrafas vedadas com rolhas de cortiça natural. Em contrapartida, para a maior parte dos vedantes sintéticos o oxigénio atmosférico difunde-se por todo o corpo do vedante. A elucidação das principais vias pelas quais o oxigénio se difunde através de diferentes tipos de vedantes em garrafas, pode permitir uma melhor compreensão do papel vedante no desenvolvimento e protecção do vinho engarrafado (Lopes et al., 2007).

A concentração de TCA na rolha pode ser diminuída pela simples exposição ao ar, podendo o processo ser acelerado pelo aumento do teor de humidade e calor (Barker., 2001). O Grupo Amorim utiliza um processo de limpeza por correntes de vapor, chamado ROSA, para remover TCA da cortiça. Este processo remove 75-80 % do TCA em granulados e em rolhas de cortiça natural. Taylor et al., (2000) utilizaram dióxido de carbono supercrítico, como processo de extracção de TCA das rolhas, afirmando que todo o TCA à superfície da rolha podia ser virtualmente isolado por esta técnica. O Grupo Oeno utiliza esta técnica para remover TCA de granulados de cortiça, designando-a por Processo Diamante (Lumiar et al., 2001). Outras técnicas utilizadas incluem o tratamento por microondas (Jägger., 1999) e o uso de enzimas (Conrad et al., 1999).

## 2.2 O papel do oxigénio na evolução do vinho

No final dos anos 90, vinho branco estragado devido à oxidação foi um problema que custou só à indústria vinícola australiana \$160 milhões (USD) por ano (Waters e Williams., 1997).

Durante o envelhecimento do vinho em garrafa, a entrada de oxigénio depende da capacidade de vedação dos respectivos vedantes, sendo que estes apresentam propriedades de efeito barreira distintamente diferentes. A deterioração oxidativa do vinho engarrafado difere do envelhecimento principalmente por ser o resultado de reacções promovidas pelo oxigénio, o que resulta num vinho com uma cor, aroma e sabor diferente das mudanças produzidas durante o envelhecimento. Durante esta fase, a composição físico-química do vinho vai

evoluindo durante o período de envelhecimento em garrafa, resultado de diversas reacções catalisadas pela acidez do meio e oxigénio (Godden et al., 2004).

Têm sido relatados vários estudos sobre a avaliação do impacto de diferentes vedantes e condições de armazenamento no desenvolvimento do vinho (Chatonnet et al., 2000, Godden et al., 2001, Mas et al., 2002). Mas et al., (2002) concluíram que os vinhos eram melhor preservados quando armazenados horizontalmente, do que em posição vertical, e que os vedantes mais adequados para o desenvolvimento do vinho foram os de cortiça natural. Godden et al., (2001) avaliaram 14 tipos de vedantes diferentes, e, demonstraram que os vedantes de cápsula de rosca nesse estudo obtiveram a melhor performance em termos de minimizar a oxidação do vinho. Esses vinhos, contudo, desenvolveram-se de forma diferente dos vinhos vedados com outros vedantes, formando compostos associados aos aromas de redução ("pedra de isqueiro", "borracha", "couve"). Estes aromas também foram encontrados em outros vinhos vedados com cápsulas de rosca (Francis et al., 2003).

Waters et al., (1996) foram dos primeiros a mostrar que a absorvância a 420 nm ( $A_{420}$ ) estava negativamente correlacionada com o  $SO_2$  total de vinhos Chardonnay. Mais recentemente, Godden et al., (2001) reportaram que garrafas de vinho Semillon oxidado exibiam alta  $A_{420}$  e baixos níveis de  $SO_2$  livre e total. Alterações na cor de vinhos brancos como resultado da oxidação acontecem devido a reacções entre o oxigénio e os constituintes fenólicos do vinho, provavelmente mediados por iões metálicos (Clark e Scollary., 2002, Clark et al., 2003).

A temperatura é um parâmetro fundamental para a produção e conservação dos vinhos. O aumento da temperatura conduz a uma aceleração das reacções físico-químicas, levando ao aparecimento dos efeitos do envelhecimento. Aparentemente as reacções e mecanismos são os mesmos, mas acelerados. As condições adequadas de armazenamento para vinhos engarrafados incluem uma temperatura bastante baixa e constante (10-12 °C para vinhos brancos; 16-18 °C para vinhos tintos) restritos à luz (especialmente UV) e vibrações (Peynaud., 1993).

Durante a evolução de um vinho verde, as principais substâncias que sofrem alterações são os ésteres, os compostos monoterpénicos, os norisoprenóides em  $C_{13}$ , os fenóis voláteis, os compostos sulfurados e os derivados furfurais. A velocidade das reacções a que se dão estas alterações depende da temperatura, do pH do meio e da concentração a que cada reagente se encontra. A composição em ésteres sofre uma redução lenta pois as reacções entre os reagentes (éster, água, etanol e ácido) são puramente químicas e ocorrem até se atingir o estado de equilíbrio (Bayonove et al., 1998). A composição dos compostos terpénicos sofre uma evolução devido à abundância de compostos monoterpénicos no vinho. Estes ao longo da evolução do vinho sofrem reacções em meio ácido, dando origem a reacções de isomerização, ciclização, hidratação, desidratação e oxigenação culminando num aumento da composição dos compostos terpénicos. Por outro lado, a composição dos álcoois superiores ao longo da evolução do vinho é pouco alterada (Oliveira., 2000).

### 3 Estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA do interior da rolha natural para o vinho

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA do interior da rolha natural para o vinho engarrafado. O deutério-2,4,6-TCA foi utilizado para se distinguir a contaminação artificial e a eventual contaminação natural das rolhas de cortiça com 2,4,6-TCA.

#### 3.1 Metodologia

A metodologia utilizada foi desenvolvida pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos e otimizada por uma aluna do MIEQ. A metodologia baseia-se na contaminação do interior de rolhas de cortiça natural com uma solução etanólica de d<sub>5</sub>-TCA, a uma concentração de 100 mg/L.

##### 3.1.1 Contaminação do interior das rolhas de cortiça natural

Uma solução etanólica (96 %) de d<sub>5</sub>-TCA foi preparada com uma concentração de 100 mg/L (1000 ng) (CDN Isótopos, Alemanha). Esta solução foi armazenada no congelador (-4°C) antes da sua utilização.

Cerca de 200 rolhas (Amorim & Irmãos, Santa Maria de Lamas) foram contaminadas artificialmente com a solução acima descrita segundo o seguinte protocolo:

O centro das rolhas foi marcado com uma cruz para assinalar o local de contaminação de d<sub>5</sub>-TCA. Em seguida as rolhas foram perfuradas com uma agulha de 12 mm de comprimento (raio da rolha) para abrir um canal por onde seria injectada a solução na rolha.

Numa hotte, injectou-se 10 µL da solução d<sub>5</sub>-TCA na rolha de cortiça natural e tapou-se o orifício com cola Araldite Ceys<sup>®</sup>. Deixou-se secar e estabilizar todas as rolhas durante 48 horas à temperatura ambiente.

##### 3.1.2 Engarrafamento

Das 200 rolhas contaminadas e isentas de TCA superficial (previamente analisado) escolheram-se aleatoriamente 72. Estas rolhas foram utilizadas para vedar garrafas tipo bordalesa de 375 mL com vinho branco de 2007 (Tabela 3.1)

Tabela 3.1: Propriedades físico-químicas do vinho branco Marquês de Cáceres, realizada pela CVRVV (adaptado de Lopes., 2008)

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



Tabela 3.2: Condições de engarrafamento (adaptado de Lopes., 2008)

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

A duração do ensaio da migração do d<sub>5</sub>-TCA do interior da rolha para o vinho foi prevista para 36 meses, com medições periódicas de d<sub>5</sub>-TCA no vinho e nas rolhas aos 9, 30 dias, 4, 8, 12, 18, 24 e 36 meses. Tendo sido este um projecto iniciado por uma aluna do MIEQ, que já tinha efectuado a medição ao ponto referente aos 9 dias, durante este estágio efectuaram-se as medições correspondentes aos 30 dias e 120 dias (4 meses) após a contaminação artificial das rolhas naturais.

### 3.1.3 Análise de d<sub>5</sub>-TCA no vinho, na superfície e no interior das rolhas

No início do estudo e em cada período de análise foram analisadas 9 garrafas de acordo com o seguinte procedimento: corte do gargalo da garrafa com auxílio de uma lâmina. Retirou-se 10 ml de vinho para análise de d<sub>5</sub>-TCA por GC-MS (protocolo de análise descrito em anexo A1.2). Em seguida o gargalo da garrafa foi quebrado e as rolhas foram colocadas a macerar superficialmente em 45 ml de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) durante 24 horas. Na análise efectuada a 4 meses foi cortado a “lâmina” de cortiça que estava em contacto com vinho e colocada a macerar individualmente em 60 ml de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) durante 24 horas. Após a maceração superficial, analisou-se o nível de d<sub>5</sub>-TCA no interior da rolha seccionando cada uma das rolhas vertical e horizontalmente a partir da marca de injeção. Os pedaços resultantes foram macerados individualmente em 60 ml de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) durante 24 horas. O d<sub>5</sub>-TCA nos diferentes macerados foi identificado e quantificado por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa GC-MS (anexo A1).



Figura 3.1: Esquema do modo de seccionamento da rolha para as diferentes análises

### 3.1.4 Tratamento Estatístico dos dados

Os resultados foram sujeitos a análise estatística, usando um programa acoplado ao Microsoft Office Excel, o XLSTAT – Statistical software. Neste programa, seleccionou-se a realização da análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e teste de Fisher.

## 3.2 Resultados

Após 30 e 120 dias de conservação, foi possível verificar que o vinho branco não se encontrava contaminado com d<sub>5</sub>-TCA. No entanto, observou-se que as rolhas de cortiça natural apresentavam traços de d<sub>5</sub>-TCA na superfície, principalmente a 120 dias de análise (figura 3.2). Contudo, verificou-se que as partes das rolhas que estavam em contacto com o vinho também

não se encontravam contaminadas com d<sub>5</sub>-TCA. Estes resultados parecem mostrar que a contaminação superficial das rolhas está localizada lateralmente junto do canal de entrada onde se fez a injeção (devido à compressão-relaxação sofrida pela rolha durante o engarrafamento).

A análise interna das rolhas de cortiça mostrou que estas estavam bastante contaminadas (16,75 ng em média, após 120 dias) (figura 3.3). Os valores obtidos a 30 e 120 dias não são significativamente diferentes mas são significativamente inferiores aos obtidos após 0 e 9 dias de conservação ( $p < 0,05$ ) (Lopes., 2008). Como a análise da superfície das rolhas não foi efectuada a 9 dias não se pode avaliar se esta diminuição foi devida à migração de d<sub>5</sub>-TCA do interior para a superfície lateral das rolhas.

Os resultados obtidos neste ensaio mostram claramente que o d<sub>5</sub>-TCA intrínseco não migra através das células de cortiça para o vinho. Estes resultados confirmam outros obtidos anteriormente que mostraram que só a superfície das rolhas em contacto com o vinho ou headspace acima do vinho, seria capaz de transmitir cloroanísóis (Pollnitz et al., 1996, Capone et al., 1999 e 2002). Estes resultados parecem mostrar que a possibilidade, colocada no início deste trabalho, de migração do d<sub>5</sub>-TCA juntamente com o ar contido nas células de cortiça é bastante remota. Contudo, apenas se passaram 4 meses após o engarrafamento, as próximas análises a 8 e 12 meses serão certamente mais conclusivas.

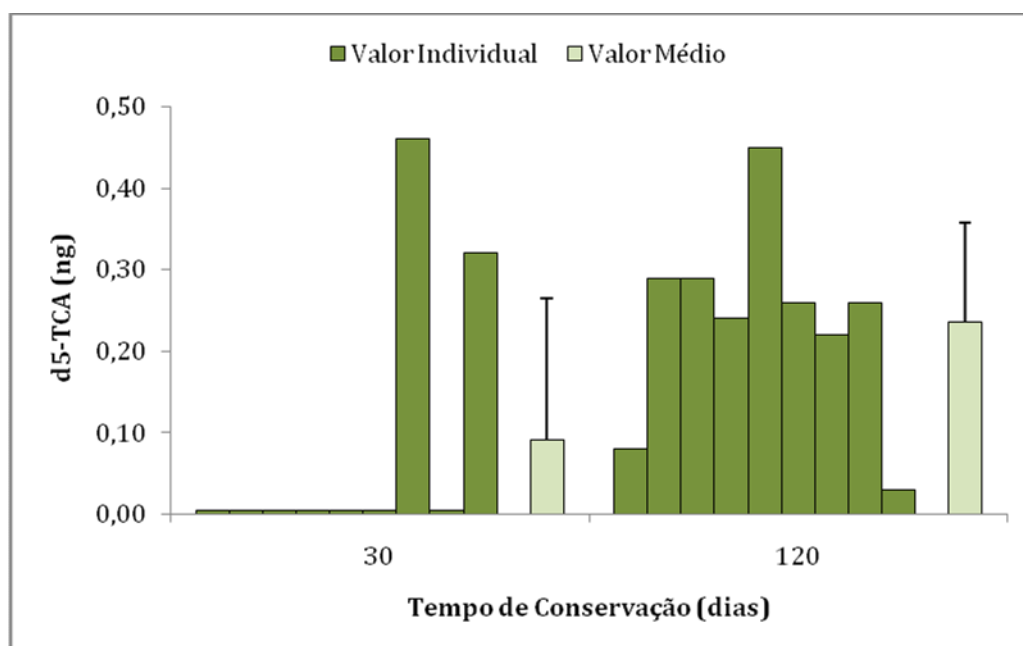


Figura 3.2: Quantidade de d<sub>5</sub>-TCA à superfície das rolhas naturais aos 30 e 120 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão de 9 amostras.

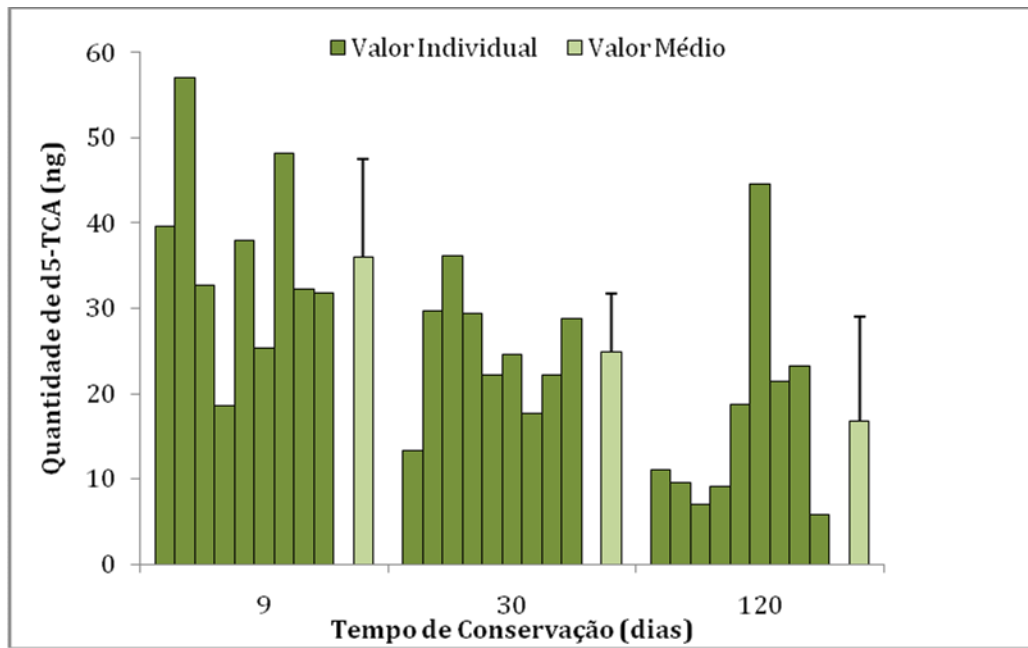


Figura 3.3: quantidade de d<sub>5</sub>-TCA no interior das rolhas de cortiça, previamente contaminadas com 1000 ng. As barras verticais indicam o desvio padrão de 9 amostras.

## 4 Estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosférico para o interior de uma garrafa de vinho

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosférico para o interior da garrafa, concretamente para a solução hidroalcoólica a 12 % que substitui o vinho neste estudo, vedada com diferentes tipos de vedantes. Utilizou-se <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP e d<sub>5</sub>-TCA para contaminar a atmosfera envolvente da garrafa para se distinguir a contaminação artificial e a eventual contaminação natural com 2,4,6-TCA.

### 4.1 Metodologia

A metodologia utilizada foi desenvolvida pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos e otimizada por uma aluna do MIEQ. A metodologia baseia-se na contaminação da atmosfera do frasco (2 L), com uma solução etanólica de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, com uma quantidade aproximada de 64 µg e 74 µg, respectivamente.

#### 4.1.1 Contaminação atmosférica

90 meias garrafas de vinho com solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) foram colocadas individualmente em frascos de vidro de 2 L. Em seguida, pipetou-se 30 µL da solução contaminante e aplicou-se a gota na parede do frasco. 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. A atmosfera ficou teoricamente contaminada com 63675 ng/(2 L<sub>gás</sub>) de d<sub>5</sub>-TCA e com 73575 ng/(2 L<sub>gás</sub>) de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP.

#### 4.1.2 Engarrafamento

Foram testados três diferentes tipos de vedantes: rolhas naturais (38 mm x 24 mm), rolhas técnicas Neutrocork (38 mm x 24 mm) (Amorim & Irmãos, Santa Maria de Lamas, Portugal) e rolhas sintéticas Nomacorc Classic (37 mm x 24 mm), adquiridas junto a um produtor de vinho (Kumala Wines, África do Sul).

As garrafas foram arrolhadas com os diferentes vedantes, segundo as condições apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições de engarrafamento (adaptado de Lopes., 2008)

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

A duração do ensaio da migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosférico para o interior da garrafa de vinho foi prevista para 48 meses, com medições periódicas de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP no vinho e nos vedantes aos 1, 3, 6, 12, 24 e 48 meses de conservação, analisando 15 frascos, 5 para cada tipo de vedante em estudo. Sendo este um projecto iniciado por uma anterior estagiária do MIEQ, que já tinha efectuado a medição ao ponto referente ao primeiro mês, durante este estágio efectuou-se as medições correspondentes aos pontos 3 e 6 meses após a contaminação atmosférica.

#### 4.1.3 Análise de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP na atmosfera nas rolhas e na solução hidroalcoólica

Em cada período de análise foram analisadas 15 garrafas no total, 5 para cada tipo de vedante, de acordo com o seguinte procedimento: corte do gargalo da garrafa com auxílio de uma lâmina. Retiraram-se 10 ml de vinho para análise de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP por GC-MS (protocolo de análise descrito em anexo A1.2). Em seguida o gargalo da garrafa é quebrado e as rolhas seccionadas em três partes (superior, intermédia e inferior) que foram colocadas a macerar em 60 ml de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) durante 24 horas, a fim de quantificar o nível de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP. Na análise efectuada a 1 e 3 meses, avaliou-se o nível de contaminação atmosférico do frasco (anexo A1.2). O d<sub>5</sub>-TCA e o <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP nos diferentes macerados foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa GC-MS (anexo A1).

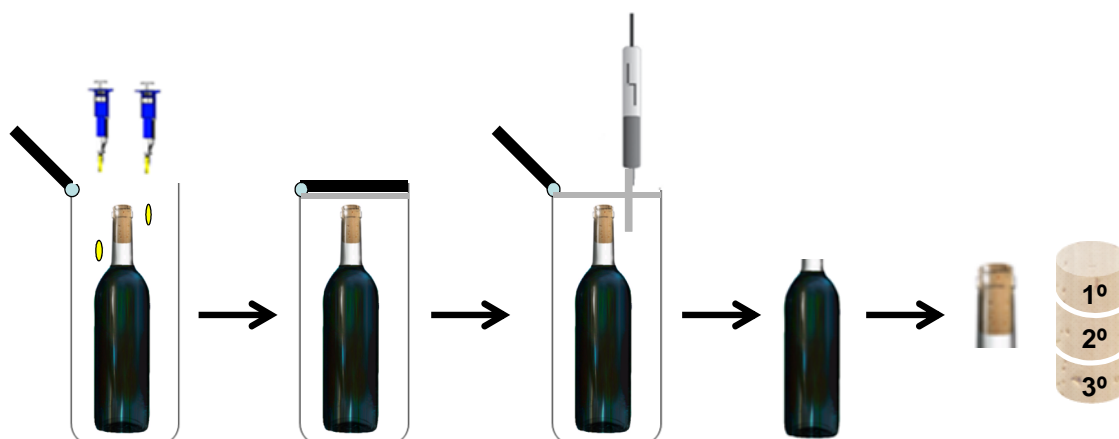


Figura 4.1: Esquema de contaminação da atmosfera dos frascos e posterior extracção e corte da rolha

Tanto na análise dos 3 meses como na dos 6 meses, foi realizada uma prova sensorial às soluções hidroalcoólicas.

## 4.2 Resultados

Após três meses de conservação, verificou-se que a atmosfera de todos os frascos estava ainda contaminada com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP (figura 4.2). A 6 meses, esta análise não foi realizada devido a problemas técnicos; contudo, sensorialmente foi possível confirmar que a atmosfera estaria bastante contaminada com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP. Observou-se que os valores da contaminação atmosférica diminuíram do 1º mês para o 3º mês, devido a uma possível maior absorção e consequente migração dos contaminantes por parte dos vedantes, mas também devido a perdas registadas, pois o sistema não é totalmente hermético, tendo-se verificado na zona de armazenamento dos frascos uma atmosfera com aroma a estes contaminantes.

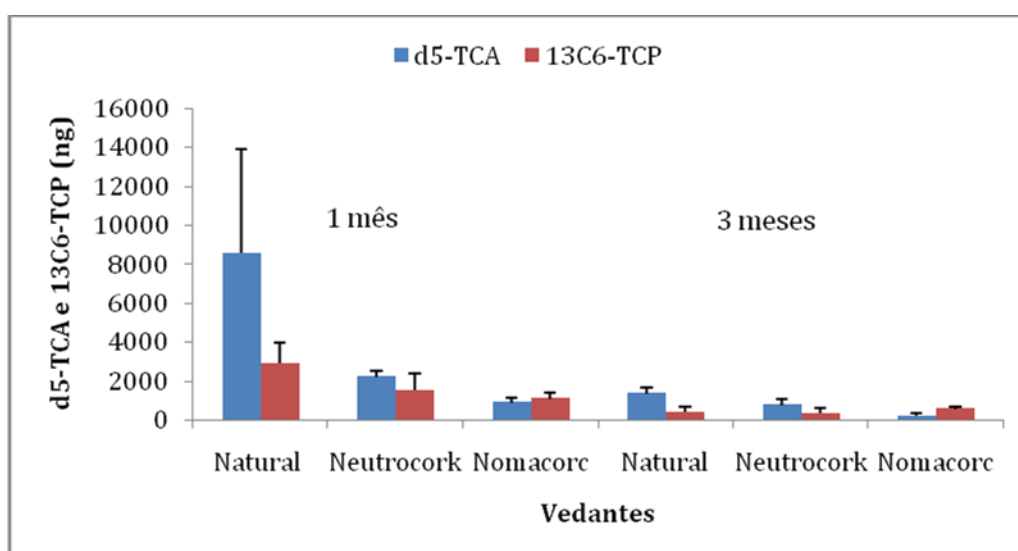


Figura 4.2: Quantidade média de d<sub>5</sub>-TCA e de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP presentes na atmosfera dos frascos 1 e 3 meses após a contaminação da mesma com 63675 ng/(2 L<sub>gás</sub>) e com 73575 ng/(2 L<sub>gás</sub>), respectivamente. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

Numa análise mais detalhada da figura 4.2, foi possível verificar que ao longo do tempo, as atmosferas de conservação das garrafas vedadas com Nomacorc apresentaram contaminações, principalmente com d<sub>5</sub>-TCA, inferiores às atmosferas de conservação das outras garrafas. Estes resultados parecem mostrar que existe uma maior absorção de d<sub>5</sub>-TCA por parte dos vedantes Nomacorc.

A hipótese acima colocada, foi confirmada com as análises químicas após 3 e 6 meses de conservação. Nestes períodos de análise, 3 e 6 meses, constatou-se que as soluções hidroalcoólicas vedadas com Nomacorc estavam contaminadas em média com 9 ng e 163 ng de d<sub>5</sub>-TCA, respectivamente (figura 4.3). Nestas mesmas garrafas foi detectado em média 8 ng e 44 ng de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP após 3 e 6 meses, respectivamente (figura 4.4). Observou-se assim um aumento de mais de 18 vezes na quantidade de d<sub>5</sub>-TCA que chegou à solução hidroalcoólica aos 6 meses relativamente ao ponto dos 3 meses, e mais de 5 vezes de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP. O facto de o TCA ser mais volátil poderá explicar esta variação. No caso das soluções vedadas com rolhas de cortiça

natural e Neutrocork não foi detectado d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP ao longo dos 6 primeiros meses de conservação (figura 4.3 e 4.4).

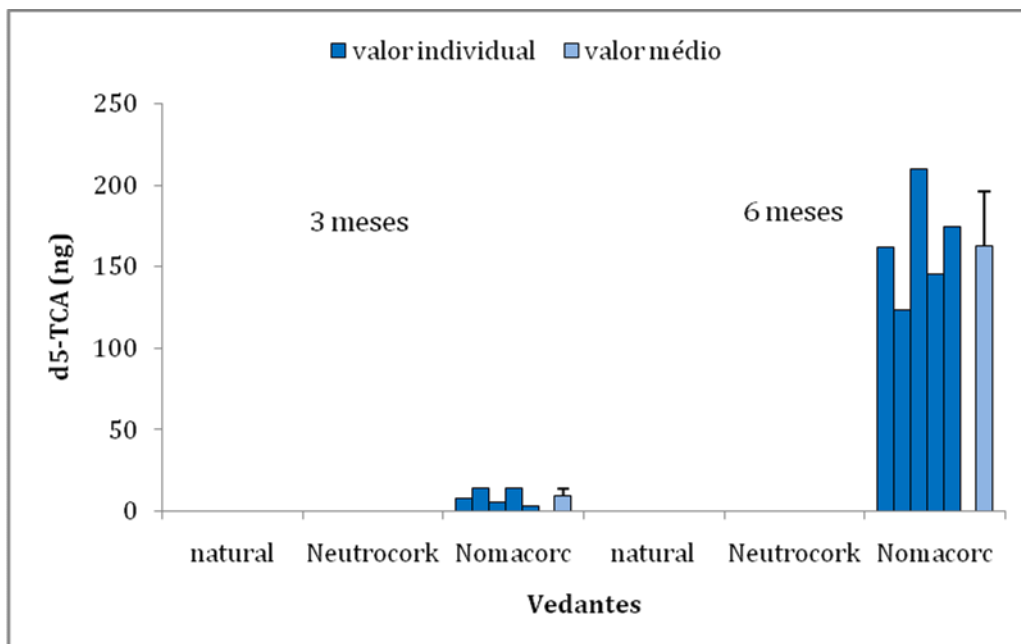


Figura 4.3: Concentrações de d<sub>5</sub>-TCA extraídas das soluções hidroalcoólicas após 3 e 6 meses de conservação. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

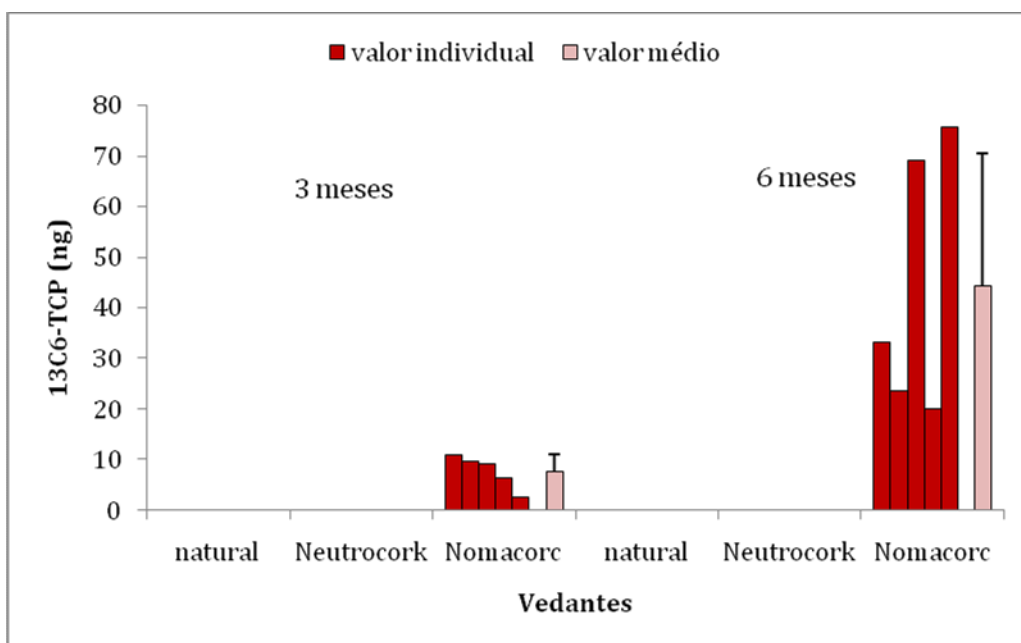


Figura 4.4: Concentrações de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP extraídas das soluções hidroalcoólicas após 3 e 6 meses de conservação. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

As análises efectuadas às diferentes partes dos vedantes mostraram que as rolhas de cortiça natural absorvem significativamente mais d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP no primeiro terço (parte da rolha que está em contacto directo com a atmosfera contaminada) que os outros vedantes.

Também foi possível detectar d<sub>5</sub>-TCA (16 ng em média) no terço intermédio da rolha, mas apenas após 6 meses de conservação. Na parte inferior da rolha de cortiça natural nunca foi detectado d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP.

Relativamente às rolhas Neutrocork, observou-se que a contaminação de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP esteve sempre confinada ao terço que estava em contacto directo com a atmosfera. A absorção de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP é semelhante àquela efectuada pela rolha de cortiça natural após 3 e 6 meses. Nas partes intermédias e inferiores não foi detectado qualquer contaminação com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP.

Relativamente aos vedantes Nomacorc, constatou-se que todo o vedante está contaminado com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, principalmente após o 1 mês de conservação. A contaminação das partes intermédias e inferiores aumentaram ao longo do tempo. Estes resultados confirmam assim a contaminação da solução hidroalcolica acima descrita.

Em suma, estes resultados mostram claramente que a migração de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP segue o mesmo mecanismo de transmissão de oxigénio destes vedantes. O vedante Nomacorc é completamente permeável a qualquer tipo de composto/contaminante atmosférico, particularmente após o primeiro mês de engarrafamento. Já as rolhas de cortiça, oferecem uma protecção efectiva contra este tipo de contaminação. Tendo em conta os resultados de transmissão de oxigénio, não é espectável que o comportamento da rolha Neutrocork se altere durante tempos de conservação mais longos. No caso da rolha de cortiça natural será necessário realizar outras análises (em períodos de conservação mais longos) para avaliar se a migração de d<sub>5</sub>-TCA na parte intermédia da rolha avançará até ao vinho ou se ficará localizada nesta parte intermédia.

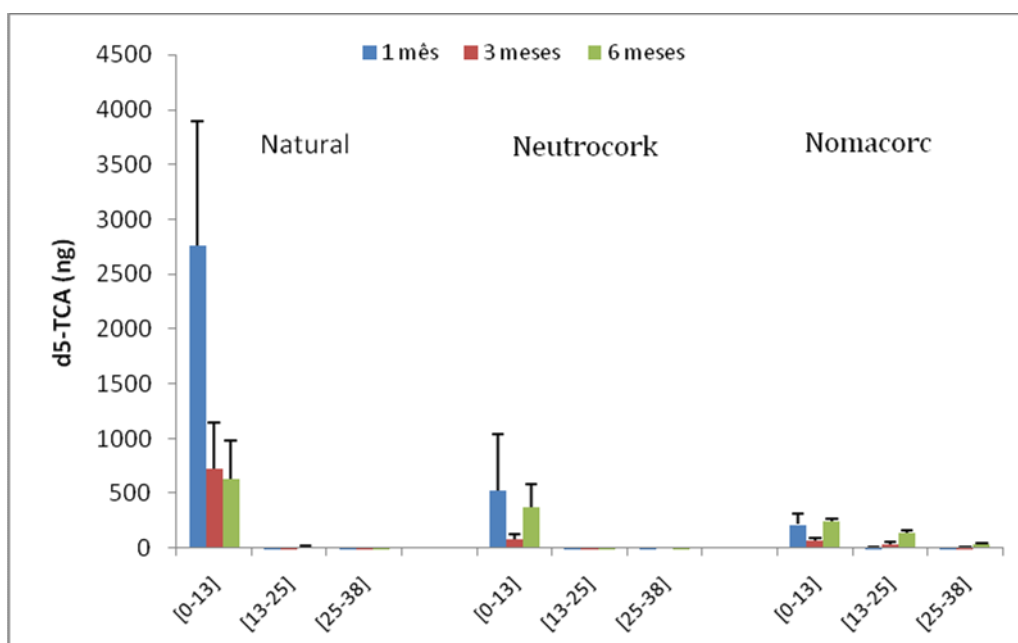


Figura 4.5: Média das concentrações de d<sub>5</sub>-TCA nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

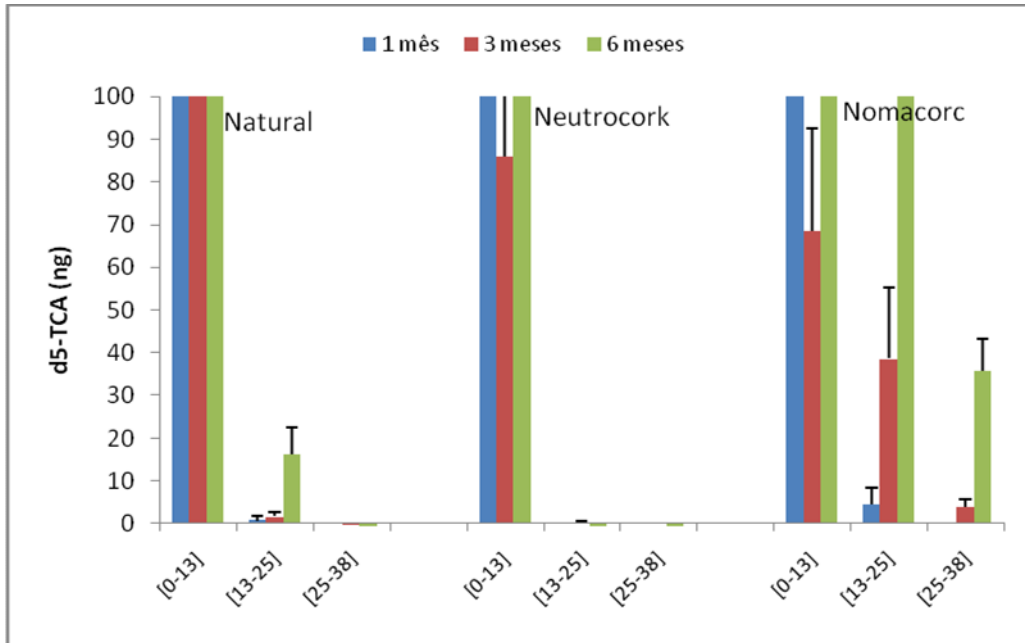


Figura 4.6: Média das concentrações de d<sub>5</sub>-TCA nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

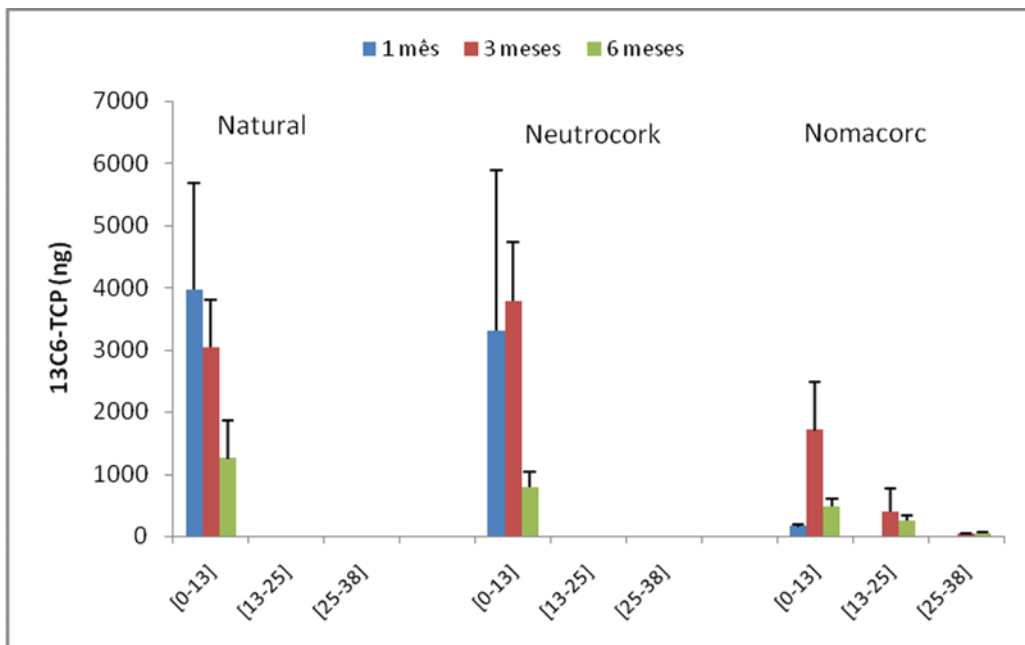


Figura 4.7: Média das concentrações de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

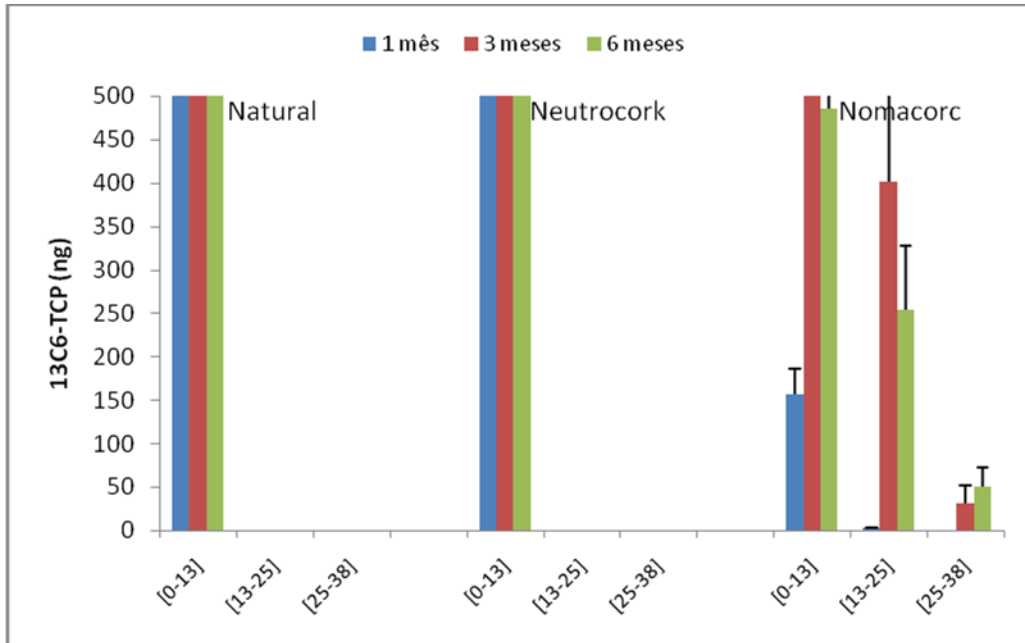


Figura 4.8: Média das concentrações de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP nas três secções em que se dividiram os vedantes. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

## 5 Estudo do desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo do desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes.

### 5.1 Metodologia

#### 5.1.1 Parâmetros dos ensaios

A metodologia utilizada foi desenvolvida pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos e otimizada por uma aluna do MIEQ. A metodologia baseia-se no desenvolvimento de um novo método para envelhecimento acelerado de um vinho.

Realizou-se um ensaio sob diferentes condições de temperatura: temperatura de 16-18 °C, representativo da evolução normal e temperatura constante de 27 °C, simulando o envelhecimento acelerado.

A duração do ensaio foi prevista para 24 meses, com medições periódicas aos 0, 2, 6, 9, 12 e 24 meses. Em cada período de tempo analisaram-se 30 garrafas no total, 15 por ensaio, 5 por tipo de vedante. Sendo este um projecto iniciado por uma anterior estagiária do MIEQ, que já tinha efectuado as medições aos pontos 0 e 2 meses, durante este estágio efectuou-se a medição correspondente ao ponto de 6 meses após o engarrafamento.

#### 5.1.2 Engarrafamento

Foram testados três diferentes tipos de vedantes, rolhas de cortiça natural (38 mm x 24 mm), Portocork (Santa Maria de Lamas, Portugal); rolhas Neutrocork (38 mm x 24 mm), Manuel Pereira de Sousa (Paços de Brandão, Portugal) e cápsulas de rosca metálicas (screw-caps), constituídas por junta saranex, cedidas pela empresa vitivinícola onde foi realizado o engarrafamento. As rolhas de cortiça natural e Neutrocork foram lavadas com peróxido de hidrogénio e tratadas com óleo de silicone/parafina (50/50) e parafina, respectivamente. Encontram-se especificações sobre as dimensões dos vedantes de cortiça no anexo B1.1.

As garrafas do ensaio de evolução normal foram armazenadas em posição horizontal numa garrafeira sob temperatura controlada (16-18 °C). No ensaio de envelhecimento acelerado, utilizou-se uma estufa de incubação refrigerada modelo Raypa (modelo IRE-475, gama de temperatura de 0 a 45,0 ± 0,1 °C).

No ensaio foi utilizado um vinho verde branco (Sogrape., 2007) cujas características químicas se encontram representadas na tabela 5.1. As garrafas bordalesas de 0,75 L foram cheias a 80 mm (medidos a partir do topo da garrafa) no caso de arrolhamento com cortiça e a

63 mm na vedação com cápsulas. No final foram vedadas 180 garrafas (60 por tipo de vedante). Após o engarrafamento, as garrafas foram devidamente acondicionadas em posição horizontal, nos respectivos locais de ensaio. Na garrafeira, foram colocadas 90 garrafas, 30 de cada tipo de vedante. Informações sobre o vinho, tipo de garrafas e nível de enchimento encontram-se no anexo B1.2.

Tabela 5.1: Resultados da análise físico-química ao vinho (análises realizadas na CVRVV, adaptado de Sampaio., 2008)

Ensaio	Resultado	Unidade
Título alcoométrico volúmico adquirido	9,1	% vol.
Massa volúmica	0,99758	g/cm <sup>3</sup>
Extracto seco total	30,5	g/dm <sup>3</sup>
Extracto não redutor	18,7	g/dm <sup>3</sup>
Açúcares redutores	11,8	g/dm <sup>3</sup>
Acidez total	6,1	g(ácido tartárico)/dm <sup>3</sup>
Acidez volátil	0,23	g(ácido acético)/dm <sup>3</sup>
Acidez fixa	5,8	g(ácido tartárico)/dm <sup>3</sup>
pH	2,99	
Dióxido de enxofre livre	29	mg/dm <sup>3</sup>
Dióxido de enxofre total	178	mg/dm <sup>3</sup>
Título alcoométrico volúmico total	9,8	% vol.
Ácido ascórbico	95	mg/dm <sup>3</sup>
Relação álcool peso / Extracto não redutor	4,2	

### 5.1.3 Análise das rolhas

A absorção e migração das rolhas de cortiça foram medidas após o desarmar das garrafas. Para o cálculo da absorção pesaram-se as massas das rolhas; para o cálculo da migração, mediram-se com uma régua as manchas de líquido presentes nas rolhas (exemplo dos cálculos em anexo B2.2).

### 5.1.4 Análise da cor

A análise da cor no vinho foi realizada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível. Foi usado um espectrofotómetro Jasco V-650 e cuvetes de quartzo com 1 cm<sup>3</sup>. Leu-se a absorvância a 420 nm (característica da cor amarela).

### 5.1.5 Análise de dióxido de enxofre e ácido ascórbico

Na CVRVV, a determinação de dióxido de enxofre e de ácido ascórbico seguem o método citado no regulamento (CEE) 2676/90 para determinações analíticas, publicado no Jornal Oficial das Comunidades Europeias a 17/09/1990.

### 5.1.6 Caracterização aromática do vinho por cromatografia gasosa

A análise de compostos aromáticos do vinho foi realizada por HS-SPME acoplados a um GC-MS, para a determinação de alguns desses compostos. Foi usado um cromatógrafo gasoso Agilent 6890 series, com detector de espectroscopia de massa Agilent 5973 Network. A coluna é marca J&W Scientific, 122-7032 DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arrasto é Hélio (Air liquid, Portugal), a um caudal de 1,0 mL/min e a extracção por HS-SPME. A fibra é marca Supelco, revestimento de poliacrilato, 85 µm e temperatura máxima de 320 °C. A integração dos picos é manual, com recurso ao Enhanced ChemStation, Agilent Technologies.

Tabela 5.2: Programa de temperaturas utilizado nas análises cromatográficas

Forno	Injector	Linha de Transferência
40 °C (2 min)		
40 °C a 240 °C (20 °C·min <sup>-1</sup> )	250 °C	250 °C
240 °C (8 min)		

Retiraram-se amostras com 10 mL de vinho. Para determinar a concentração dos compostos identificados no vinho, analisaram-se padrões pelo mesmo método cromatográfico. Integraram-se as áreas dos picos e traçaram-se rectas de calibração (anexo B3), para estimar a concentração dos compostos identificados, exactamente ou por equivalência à mesma família química.

### 5.1.7 Análise sensorial

A prova organoléptica efectuada foi do tipo triangular, cujo objectivo é verificar se existe diferença entre duas amostras que sofreram processos de evolução diferentes. A prova decorreu na CVRVV numa sala climatizada, sendo o vinho avaliado por um painel de 7 provadores experientes neste tipo de provas. Cada prova correspondia a 5 séries de testes triangulares, em que se comparava o vinho do ensaio normal com o do ensaio em condições de envelhecimento acelerado. Foram realizadas 3 provas que correspondiam aos 3 tipos de vedantes utilizados (A – Naturais, B – Neutrocork e C – Cápsulas de rosca). A folha de prova da análise sensorial realizada encontra-se no anexo B1.3. Os números críticos para cada nível de significância foram obtidos a partir do número total de respostas dadas pelos provadores.

### 5.1.8 Tratamento estatístico dos dados

Foi realizada a análise estatística de todos os resultados, recorrendo a um programa acoplado ao Microsoft Office Excel, o XLSTAT – Statistical Software. Neste programa, seleccionou-se a realização da análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e teste de Fisher, com duas variáveis (tipo de ensaio e tipo de vedante) e com interacção entre eles.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 Composição química do vinho ao ponto zero

O espectro cromatográfico apresentado na figura 5.1 distingue a variedade de compostos que se decidiu estudar e analisar durante a evolução do vinho ao longo do envelhecimento em garrafa.

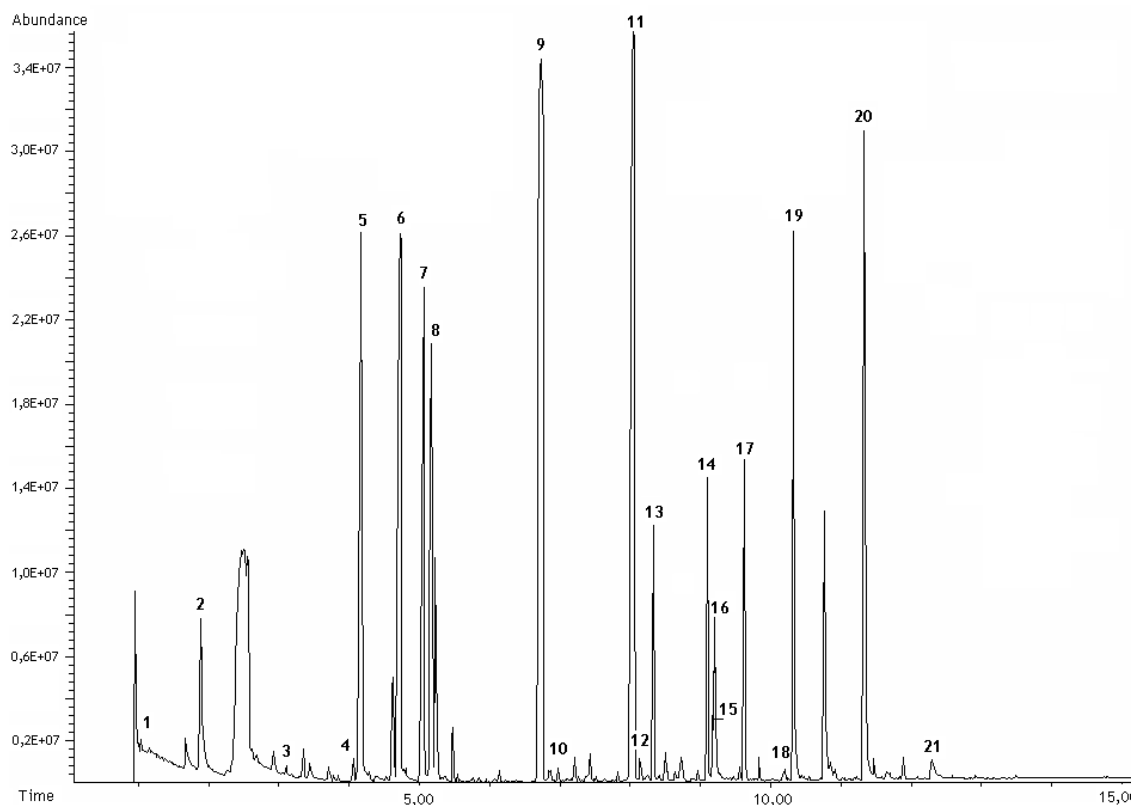


Figura 5.1: Espectro cromatográfico obtido a partir de uma amostra de vinho verde branco, 2007 (adaptado de Sampaio, 2008).

Na tabela 5.3 estão apresentadas as concentrações ao ponto zero dos compostos a analisar. Com exceção dos ácidos, os valores estão dentro da gama de concentrações esperada (Oliveira, 2000).

Tabela 5.3: Identificação dos picos cromatográficos referentes à figura 5.1 (adaptado de Sampaio, 2008)

Compostos	Legenda	t <sub>ret</sub> / min	M / g·mol <sup>-1</sup>	Concentração	
Aldeídos					
Acetaldeído	1	1,16	44,03	34,16	mg·L <sup>-1</sup>
Monoterpenos					
Nerolidol	18	10,20	222,2	7,37	µg·L <sup>-1</sup>
Etil ésteres					
Etil hexanoato	8	5,17	144,12	132,68	µg·L <sup>-1</sup>
Etil octanoato	9	6,73	172,15	475,03	
Etil decanoato	11	8,04	200,18	1755,45	
Isoamil octanoato	12	8,14	214,19	41,83	
Etil 9-decanoato	13	8,33	198,16	210,83	
Etil dodecanoato	15	9,18	228,21	92,92	
Total				2708,75	µg·L <sup>-1</sup>
Compostos					
Compostos	Legenda	t <sub>ret</sub> / min	M / g·mol <sup>-1</sup>	Concentração	
Ácidos					
Ácido hexanóico	16	9,21	116,08	37,42	mg·L <sup>-1</sup>
Ácido octanóico	19	10,32	144,12	191,80	
Ácido decanóico	20	11,33	172,15	235,92	
Ácido dodecanóico	21	12,30	200,18	12,38	
Total				477,52	mg·L <sup>-1</sup>
Ésteres acetatos					
Etil acetato	2	1,89	88,05	23,58	mg·L <sup>-1</sup>
Isoamil acetato	5	4,17	130,1	4,92	
Octil acetato	10	6,97	172,15	1,58	
Phenetil acetato	14	9,09	164,08	0,10	
Total				30,18	mg·L <sup>-1</sup>
Álcoois Superiores					
1-Propanol	3	3,46	60,06	26,29	mg·L <sup>-1</sup>
Isobutil álcool	4	4,06	74,07	0,08	
Isoamil álcool	7	5,06	88,09	3,77	
Phenetil álcool	17	9,63	122,07	1,38	
Total				31,52	mg·L <sup>-1</sup>

## 5.2.2 Análise ao fim de 6 meses de conservação

### 5.2.2.1 Análise às rolhas

Ao fim de 6 meses, observou-se que a absorção das rolhas naturais submetidas a diferentes temperaturas de conservação é idêntica ( $p = 0,05$ ). No caso das rolhas Neutrocork observou-se que a absorção é independente da temperatura de conservação ( $p = 0,05$ ). Contudo este tipo de rolhas absorve significativamente menos que as rolhas naturais (em média, 6 e 35 % para rolhas Neutrocork e naturais, respectivamente) (figura 5.2).

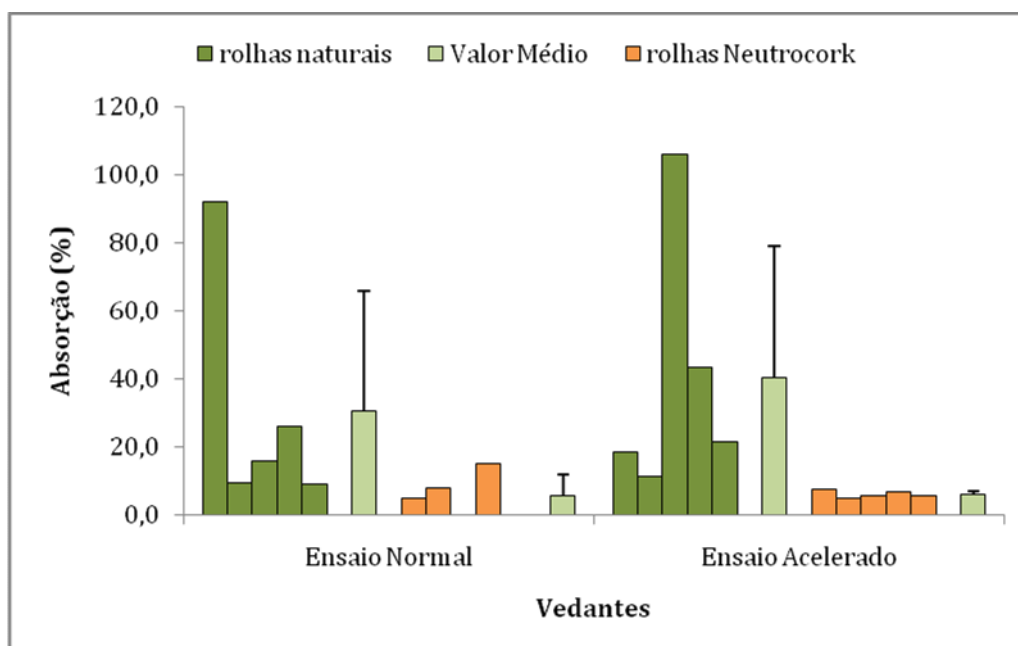


Figura 5.2: Percentagem de absorção de vinho, pelas rolhas de cortiça natural e Neutrocork, para o ensaio de evolução normal e acelerada. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

Relativamente à migração de vinho através dos vedantes de cortiça, verificou-se que a migração do vinho através das rolhas de cortiça natural é significativamente superior quando a temperatura de conservação é mais elevada ( $p < 0,01$ ). Em média, a migração através das rolhas naturais foi de 43 e 60 % para o ensaio de evolução normal e acelerado, respectivamente. No caso das rolhas Neutrocork não se verificaram diferenças de migração estatisticamente significativas entre os ensaios (em média 6 % para o ensaio de evolução normal e 7% para o ensaio de evolução acelerado) ( $p = 0,05$ ) (figura 5.3). Estes resultados foram influenciados pelo facto de as rolhas serem muito claras e de terem secado, não deixando marcas de humidade dificultando a leitura da migração de vinho pelas mesmas.

Comparativamente com os resultados obtidos pela anterior estagiária do MIEQ, aos dois meses, em que não existiam diferenças significativas ( $p = 0,05$ ) para a absorção e para a migração, entre os tipos de ensaio; aos 6 meses nota-se já diferenças significativas ( $p = 0,01$ ) de os vedantes sujeitos a temperaturas mais elevadas apresentarem valores de migração superior, nomeadamente, vedantes de cortiça natural.

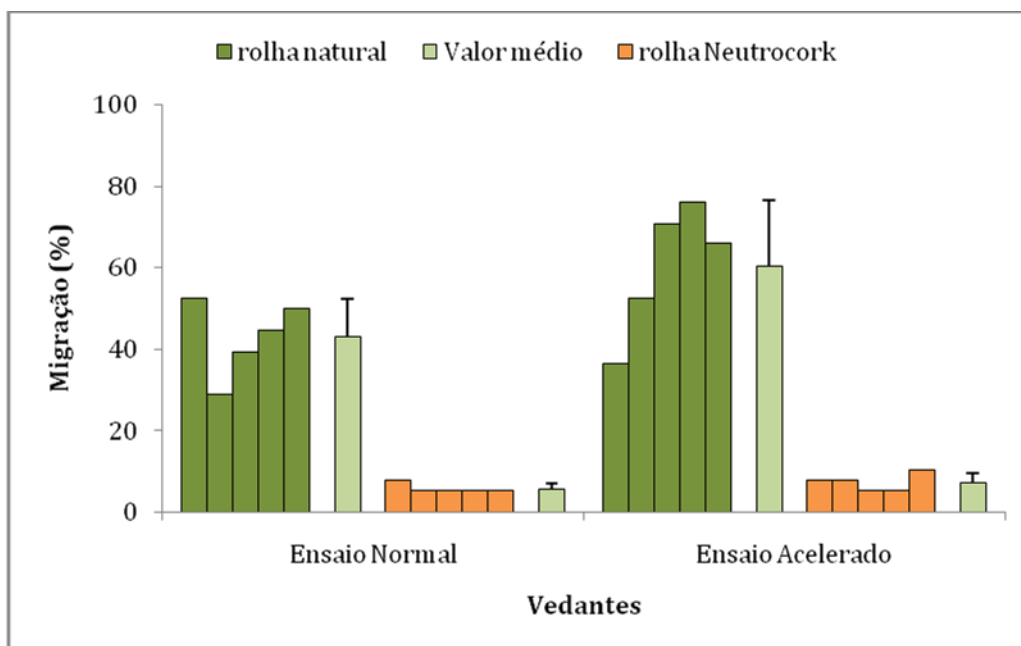


Figura 5.3: Percentagem de migração de vinho, através das rolhas de cortiça natural e Neutrocork, para o ensaio de evolução normal e acelerada. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

#### 5.2.2.2 Análise Química

Os valores da absorvância a 420 nm aumentaram ao longo do tempo de conservação para todos os vedantes em ambos os ensaios. Contudo, observou-se que para cada tipo de vedante este aumento foi significativamente superior no ensaio sob condições aceleradas (figura 5.4) ( $p < 0,01$ ). Estes resultados eram expectáveis pois a temperatura e a conservação favorece o aumento da tonalidade amarela do vinho.

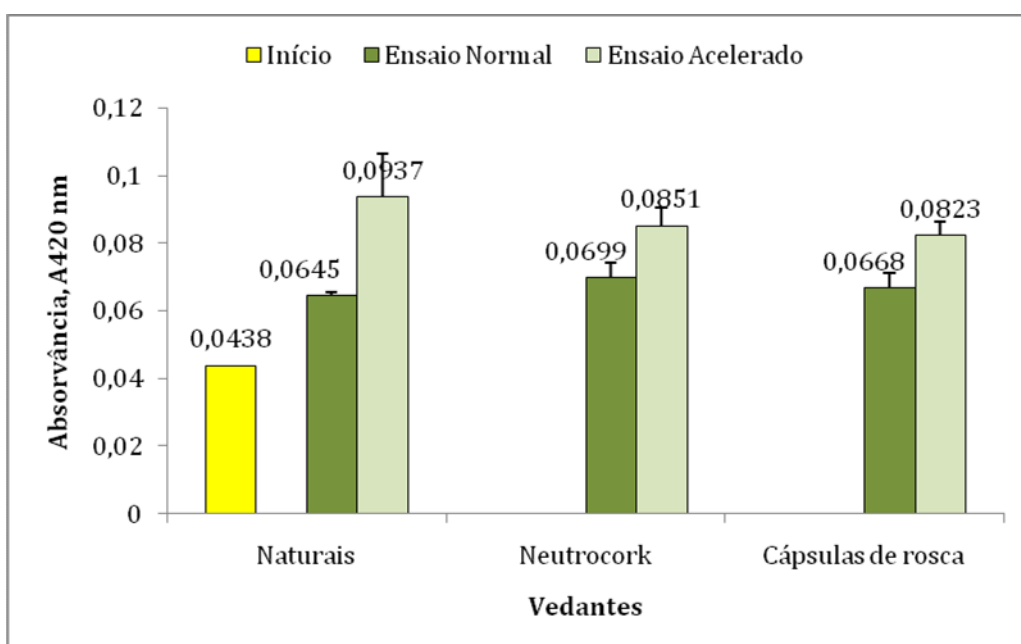


Figura 5.4: Valores da absorvância a 420 nm observados no vinho, no início e aos seis meses, para cada ensaio e tipo de vedante. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

As concentrações de SO<sub>2</sub> livre diminuíram ao longo do tempo independentemente do tipo de vedante utilizado. Observou-se também, que após 6 meses de conservação as concentrações de SO<sub>2</sub> livre para cada tipo de vedante são idênticas em ambos os ensaios (normal e acelerado) ( $p = 0,05$ ) (figuras 5.5). No caso dos vedantes naturais verificou-se uma redução de 31 e 34 % de SO<sub>2</sub> livre relativamente ao valor inicial, para o ensaio normal e acelerado, respectivamente; nos vedantes Neutrocork o SO<sub>2</sub> livre diminuiu em ambos os ensaios 34 %; nas cápsulas de rosca a redução foi de 28 e 38 %, para o ensaio normal e acelerado, respectivamente.

As concentrações de SO<sub>2</sub> total diminuem ligeiramente ao longo do tempo, particularmente no caso do ensaio normal independentemente do vedante utilizado. No entanto, observou-se que a redução das concentrações de SO<sub>2</sub> total foi significativamente superior nas garrafas conservadas a temperaturas mais elevadas ( $p < 0,01$ ) (figura 5.6). Este resultado está de acordo com a literatura uma vez que é conhecido que o aumento da temperatura conduz a um aumento do consumo do oxigénio pelo vinho e particularmente pelo SO<sub>2</sub> (Godden et al., 2001). No caso dos vedantes naturais verificou-se uma redução de 6 % de SO<sub>2</sub> total relativamente ao ensaio normal por parte do ensaio acelerado; nos vedantes Neutrocork a diminuição do SO<sub>2</sub> total no ensaio acelerado relativamente ao ensaio normal foi de 8 %; nas cápsulas de rosca a redução foi de 6 %.

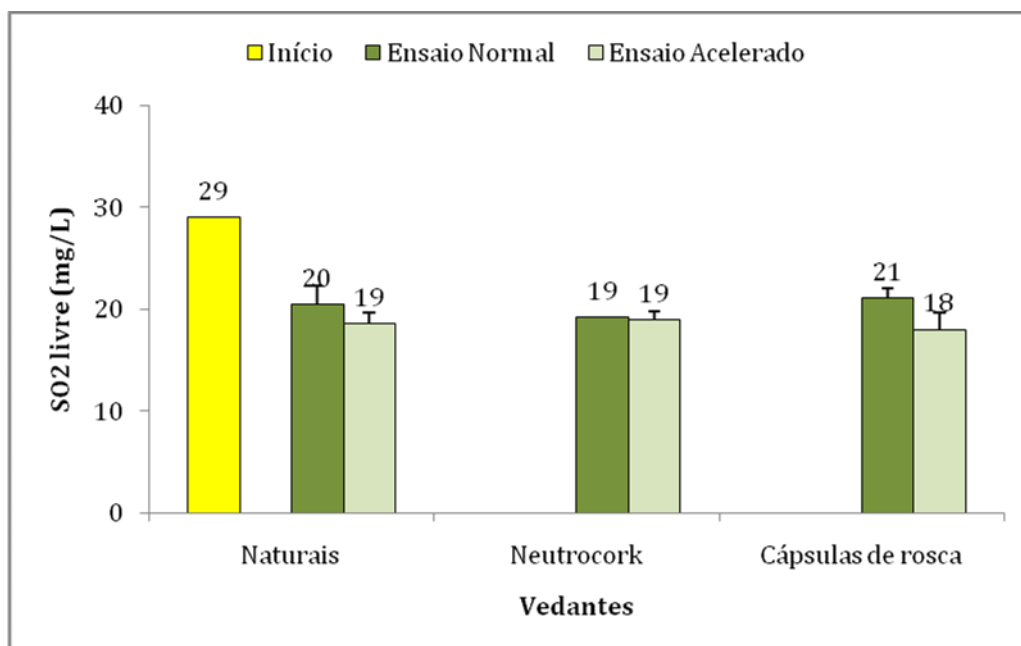


Figura 5.5: Valor das concentrações em SO<sub>2</sub> livre no vinho, obtidos no início e aos seis meses, para cada ensaio e tipo de vedante. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

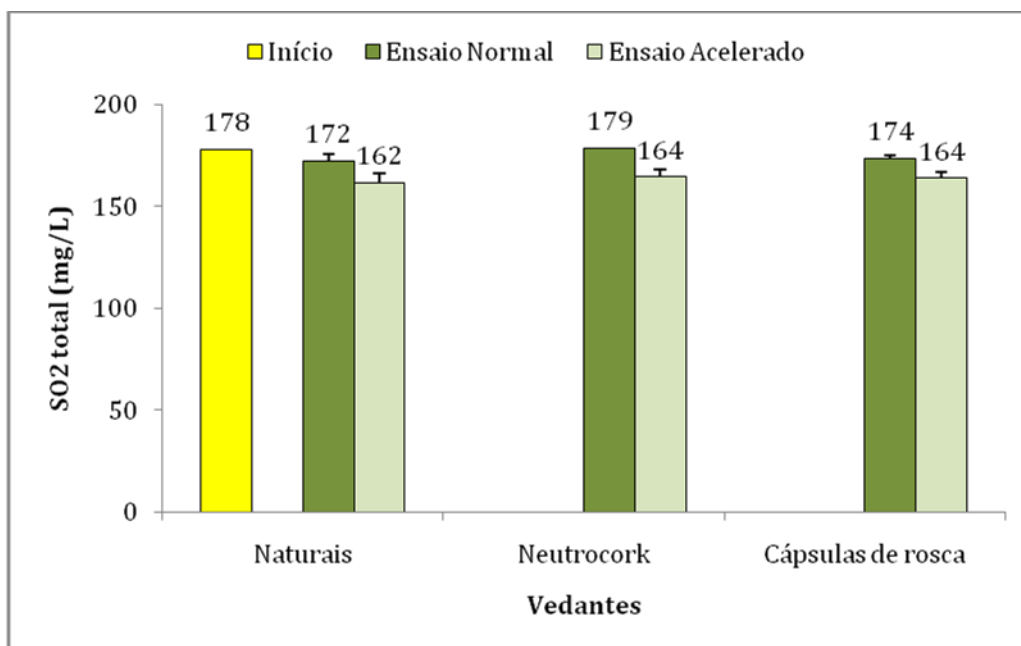


Figura 5.6: Valor das concentrações em SO<sub>2</sub> total no vinho, obtidos no início e aos seis meses, para cada ensaio e tipo de vedante. As barras verticais indicam o desvio padrão de 5 amostras.

### 5.2.2.3 Caracterização aromática

Para o total de ésteres de etilo, observou-se que o vinho sujeito a temperaturas de evolução normal apresentou concentrações significativamente superiores ao vinho sujeito a temperaturas mais elevadas de conservação, isto independentemente do tipo de vedante utilizado ( $p < 0,001$ ) (figura 5.8). Estas diferenças foram também observadas individualmente em cada composto desta família, particularmente no octanoato de etilo, 9-decanoato de etilo, dodecanoato de etilo e decanoato de etilo ( $p < 0,001$ ). No caso das rolhas naturais, verificou-se uma redução média de 19 % da concentração dos ésteres de etilo no ensaio acelerado em comparação com o ensaio normal; no caso do Neutrocork essa redução foi de 23 % e nas cápsulas de rosca a redução foi de 16 %.

Para o total de ácidos, observou-se que o vinho vedado com rolhas Neutrocork sujeito a temperaturas de evolução normal apresentou concentrações ligeiramente mais elevadas, mas estatisticamente significativas, do que o vinho sujeito a temperatura mais elevada ( $p < 0,001$ ) (figura 5.9). Esta diferença é influenciada pelo ácido decanóico. A redução média de ácidos verificada neste vedante foi de 17 % no ensaio acelerado em comparação com o ensaio normal. Não se verificaram diferenças significativas ( $p = 0,001$ ) nos vinhos vedados com rolhas naturais e cápsulas de rosca.

Para o total de ésteres acetatos, observou-se que o vinho sujeito a temperaturas de evolução normal apresentou concentrações significativamente superiores ao vinho sujeito a temperaturas mais elevadas ( $T = 27\text{ °C}$ ), isto independentemente do tipo de vedante utilizado ( $p < 0,001$ ) (figura 5.10). Estas diferenças foram também observadas individualmente em cada composto desta família nomeadamente acetato de etilo, acetato de isoamilo e acetato de

fenetilo. No caso dos vedantes naturais, verificou-se uma redução média de 47 % de ésteres acetatos no ensaio acelerado em comparação com o ensaio normal; no caso dos vedantes Neutrocork e cápsula de rosca essa redução foi de 34 %.

Para o total de álcoois superiores, observou-se que o vinho vedado com rolhas naturais e Neutrocork sujeito a temperaturas de evolução normal apresentou concentrações ligeiramente mais elevadas, mas estatisticamente significativas, do que o vinho sujeito a temperatura mais elevada ( $p < 0,001$ ) (figura 5.11). Esta diferença é influenciada pelo isoamilo álcool. A redução média de álcoois superiores verificada nestes vedantes foi de 12 % no ensaio acelerado em comparação com o ensaio normal. Não se verificaram diferenças significativas ( $p = 0,001$ ) nos vinhos vedados com cápsulas de rosca.

Contudo, estes resultados de compostos aromáticos apresentam concentrações acima do que seria espectável para este vinho, pois observou-se um aumento significativo das concentrações em relação ao valor inicial, quando seria de esperar uma certa redução. Embora, a causa objectiva seja ainda desconhecida, suspeita-se que esta diferença de resultados esteja relacionada com problemas técnicos de cromatografia e validação do método utilizado. No entanto, apesar de todos estes problemas, objectivamente estes resultados servem os nossos propósitos em termos comparativos.

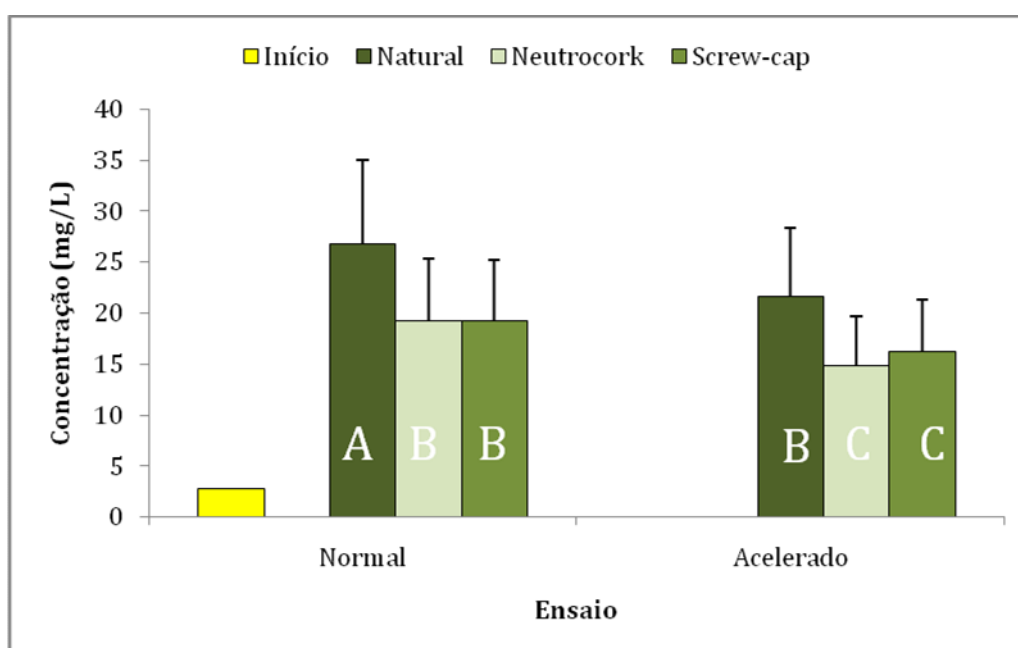


Figura 5.8: Valores médios obtidos para os Etil Ésteres. As barras verticais indicam o desvio padrão de cinco amostras. A, B, C indicam grupos estatisticamente idênticos ( $p < 0,001$ ).

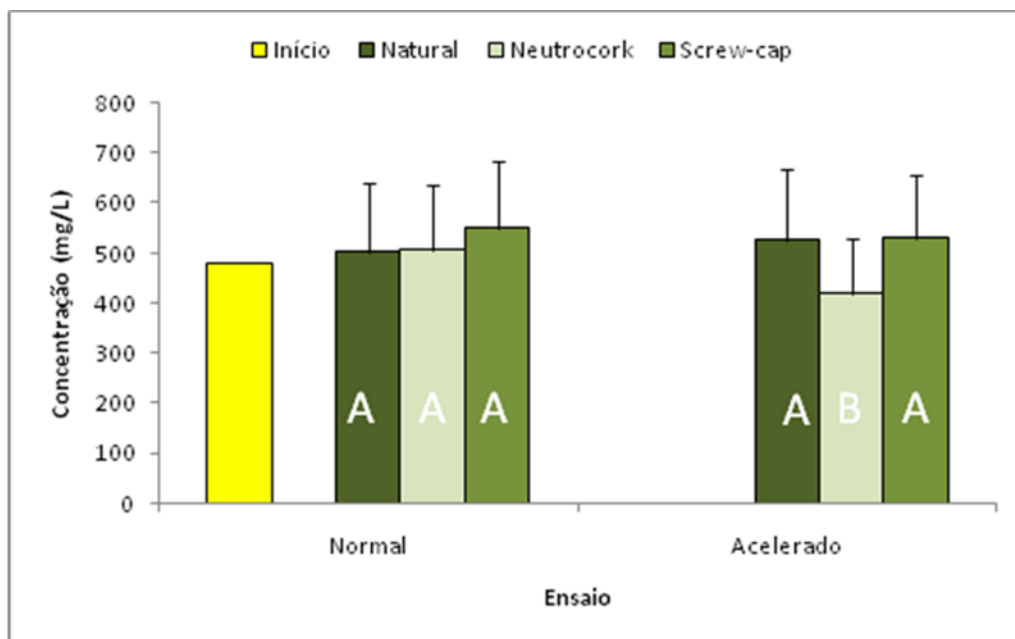


Figura 5.9: Valores médios obtidos para os ácidos. As barras verticais indicam o desvio padrão de cinco amostras. A, B indicam grupos estatisticamente idênticos ( $p < 0,001$ ).

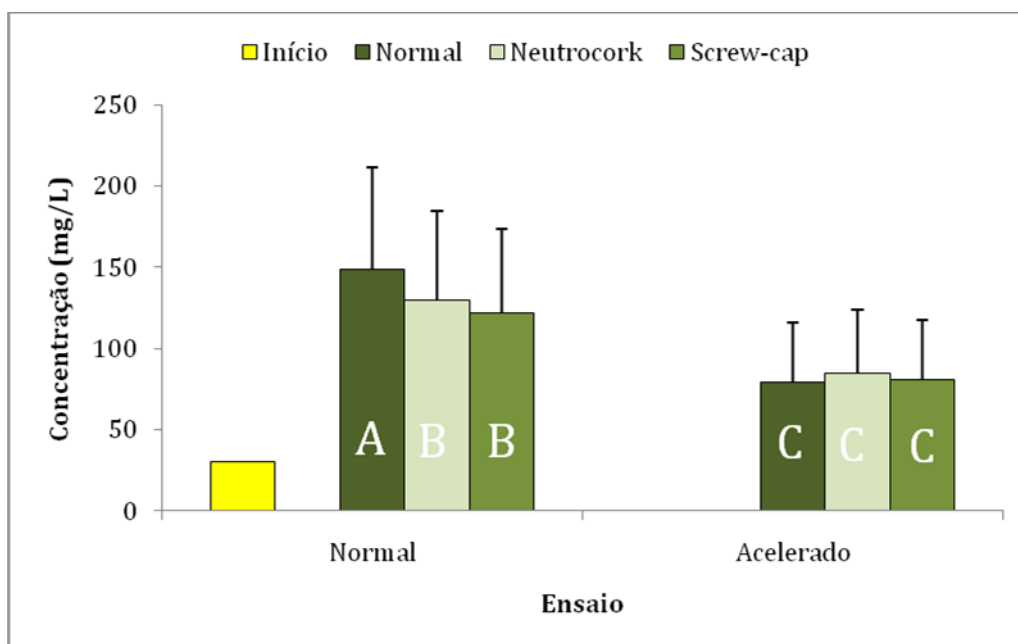


Figura 5.10: Valores médios obtidos para os Ésteres Acetatos. As barras verticais indicam o desvio padrão de cinco amostras. A, B, C indicam grupos estatisticamente idênticos ( $p < 0,001$ ).

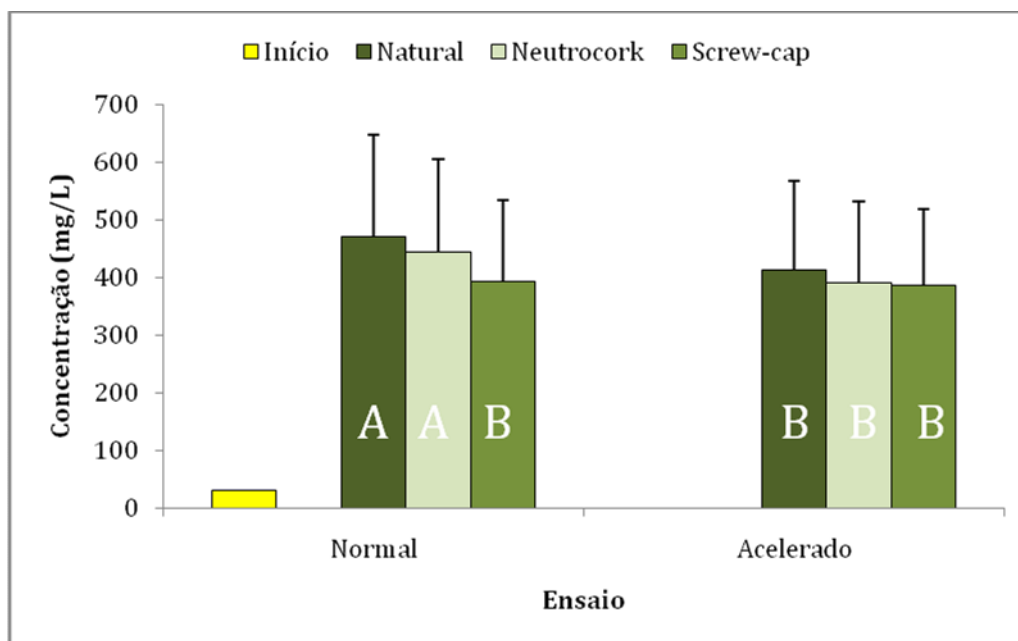


Figura 5.11: Valores médios obtidos para os Álcoois Superiores. As barras verticais indicam o desvio padrão de cinco amostras. A, B, indicam grupos estatisticamente idênticos ( $p < 0,001$ ).

#### 5.2.2.4 Análise sensorial

Os resultados obtidos na análise sensorial mostraram a existência de diferenças significativas entre os vinhos conservados a temperatura normal e os vinhos conservados a temperatura mais elevada, independentemente do tipo de vedante utilizado ( $p < 0,001$ ) (tabela 5.4). Analisando as respostas obtidas, constata-se que 63 % dos provadores consideraram o vinho conservado sob temperatura mais elevada como estando mais evoluído/oxidado, o que está de acordo com as análises químicas efectuadas. O ensaio acelerado apresenta um maior número de defeitos aromáticos, aromas a vegetal, mofo/bafio, podre e "sujo", principalmente no vinho vedado com rolhas de cortiça natural e Neutrocork (figura 5.12). Este resultado mostra que a temperatura aumenta a cinética das reacções de oxidação do vinho, mas também favorece a extracção de um maior número de componentes a partir da rolha para o vinho.

Tabela 5.4: Análise de variância para os resultados da prova organoléptica realizada por 7 provadores, em 30 amostras de diferentes garrafas.

Vedante	Respostas	Respostas certas	Número crítico p=0.5	Estatística	Número crítico p=0.01	Estatística	Número crítico p=0.001	Estatística
Rolhas Naturais	7	6	5	*	6	**	7	ns
	7	7	5	*	6	**	7	***
	7	6	5	*	6	**	7	ns
	7	6	5	*	6	**	7	ns
	7	2	5	ns	6	ns	7	ns
<b>Global</b>	<b>35</b>	<b>27</b>	<b>17</b>	<b>*</b>	<b>19</b>	<b>**</b>	<b>22</b>	<b>***</b>

Legenda	
*	0,5
**	0,01
***	0,001

Vedante	Respostas	Respostas certas	Número crítico p=0.5	Estatística	Número crítico p=0.01	Estatística	Número crítico p=0.001	Estatística
Screw-Caps	7	6	5	*	6	**	7	ns
	7	4	5	ns	6	ns	7	ns
	7	5	5	*	6	ns	7	ns
	7	7	5	*	6	**	7	***
	7	5	5	*	6	ns	7	ns
<b>Global</b>	<b>35</b>	<b>27</b>	<b>17</b>	<b>*</b>	<b>19</b>	<b>**</b>	<b>22</b>	<b>***</b>

Vedante	Respostas	Respostas certas	Número crítico p=0.5	Estatística	Número crítico p=0.01	Estatística	Número crítico p=0.001	Estatística
Rolhas Neutrocork	7	6	5	*	6	**	7	ns
	7	4	5	ns	6	ns	7	ns
	7	5	5	*	6	ns	7	ns
	7	7	5	*	6	**	7	***
	7	2	5	ns	6	ns	7	ns
<b>Global</b>	<b>35</b>	<b>24</b>	<b>17</b>	<b>*</b>	<b>19</b>	<b>**</b>	<b>22</b>	<b>***</b>

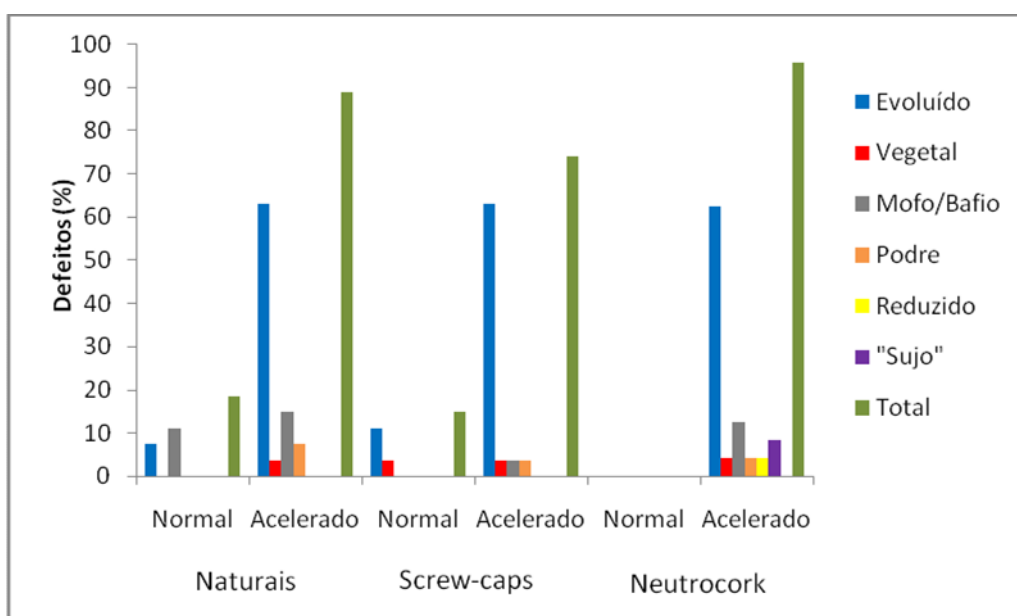


Figura 5.12: Incidência de defeitos aromáticos no vinho identificados pelo provadores.

## 6 Estudo do efeito barreira do Acquamark à passagem do 2,4,6-TCA de rolhas naturais para soluções hidroalcoólicas

Neste capítulo descreve-se a metodologia utilizada no estudo do efeito barreira do tratamento Acquamark à passagem do TCA de rolhas de cortiça natural para soluções hidroalcoólicas. O Acquamark é um processo de tratamento com uma cola de base de poliuretano e pó de cortiça com uma aplicação posterior de um revestimento à base de parafina e dióxido de titânio. Este tratamento tem por objectivo colmatar certos orifícios e poros na superfície das rolhas de cortiça de menor qualidade.

### 6.1 Metodologia

Seleccionou-se um lote de rolhas suspeito de estar contaminado com 2,4,6-TCA. Realizaram-se 20 grupos de macerações compostas de 50 rolhas em frascos de 2 L com solução hidroalcoólica (12 % de etanol) para comprovar se o lote estava de facto contaminado com 2,4,6-TCA (tabela 6.1).

Desse lote, seleccionaram-se 5480 rolhas. Metade dessas rolhas, ou seja, 2740, foram sujeitas ao tratamento Acquamark. Realizou-se assim um ensaio em paralelo, comparando rolhas Acquamark e rolhas não Acquamark.

Tabela 6.1: Valores das macerações compostas de 50 rolhas do lote inicial

Amostras Grupo de Rolhas	TCA (ng/L)
Grupo 1	3,1
Grupo 2	14,8
Grupo 3	3,0
Grupo 4	4,1
Grupo 5	4,1
Grupo 6	3,6
Grupo 7	2,5
Grupo 8	1,7
Grupo 9	1,6
Grupo 10	1,4
Grupo 11	3,7
Grupo 12	2,6
Grupo 13	1,1
Grupo 14	10
Grupo 15	11,2
Grupo 16	1,7
Grupo 17	2,2
Grupo 18	3,7
Grupo 19	9,1
Grupo 20	10,1
média	4,8
desvio padrão	4,0

Seleccionando as rolhas Acquamark, 200 rolhas foram sujeitas a macerações individuais com solução hidroalcoólica (12 % etanol) em frascos de 60 mL; 2500 rolhas foram sujeitas a macerações compostas de 50 rolhas em frascos de 2 L; 40 rolhas foram engarrafadas em garrafas previamente enchidas com 375 mL de solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) segundo as condições apresentadas na tabela 6.2. O esquema do projecto está assinalado na tabela 6.3.

Tabela 6.2: condições de engarrafamento

Rolhadora:	F. Valentin - Tipo SH
Volume de enchimento:	375 mL
Nível de enchimento:	63 mm
Temperatura do líquido:	não controlada
Depressão no headspace após engarrafamento:	não controlada

Tabela 6.3: Esquema do projecto

	Macerações Individuais		Macerações Compostas (50 rolhas)		Em Garrafa	
	Tempo de Ensaio	Número de Amostras	Tempo de Ensaio	Número de Amostras	Tempo de Ensaio	Número de Amostras
Com Acquamark	24 Horas	40	24 Horas	10	6 Meses	20
	1 Mês	40	1 Mês	10		
	3 Meses	40	3 Meses	10		
	6 Meses	40	6 Meses	10	12 Meses	20
	12 Meses	40	12 Meses	10		
Sem Acquamark	24 Horas	40	24 Horas	10	6 Meses	20
	1 Mês	40	1 Mês	10		
	3 Meses	40	3 Meses	10		
	6 Meses	40	6 Meses	10	12 Meses	20
	12 Meses	40	12 Meses	10		

A duração do ensaio do estudo do efeito barreira do Acquamark à passagem do TCA das rolhas de cortiça natural para soluções hidroalcoólicas foi prevista para 12 meses, com medições periódicas às 24 horas, 1, 3, 6 e 12 meses. Durante este estágio apenas se efectuou a medição correspondente às 24 horas.

#### 6.1.1 Análise de 2,4,6-TCA na solução hidroalcoólica

Para analisar o nível de contaminação da solução hidroalcoólica, em cada período retiraram-se 10 mL de solução para análise de 2,4,6-TCA por ECD (protocolo de análise em anexo A2.2).

#### 6.1.2 Tratamento estatístico dos dados

Foi realizada a análise estatística de todos os resultados, recorrendo ao teste de Fisher.

### 6.2 Resultados

Ao fim de 24 horas, a análise das macerações compostas mostrou a inexistência de diferenças significativas de migração de 2,4,6-TCA entre as rolhas tratadas com Acquamark e as não tratadas ( $p = 0,05$ ) (tabela 6.4). O mesmo se observou na análise das macerações individuais ao fim de 24 horas (tabela 6.5). Assim podemos constatar que o tratamento Acquamark não parece fazer barreira à passagem do TCA das rolhas para as soluções hidroalcoólicas, pelo menos durante as 24 primeiras horas de ensaio. Contudo, é muito cedo para se poder tirar conclusões definitivas, sendo preciso esperar pelo ensaio de engarrafamento (após 6 meses de conservação), para se verificar se o Acquamark actua de facto como uma barreira à transmissão do TCA.

Tabela 6.4: Valores das macerações compostas após 24 horas

Amostra	Grupo de Rolhas	
	Com Acquamark (ng/L)	Sem Acquamark (ng/L)
1	0,9	1,6
2	1,2	3,5
3	0,7	5,9
4	0,5	1,6
5	5,4	1,1
6	1,1	2,6
7	4,5	2,0
8	1,0	1,1
9	0,8	1,3
10	2,6	1,1
média	1,9	2,2
desvio padrão	1,7	1,5

Tabela 6.5: Valores das macerações individuais após 24 horas

Amostra	Rolhas Individuais	
	Com Acquamark (ng/L)	Sem Acquamark (ng/L)
1	0,5	0,5
2	0,5	0,6
3	0,5	1,0
4	4,3	1,5
5	0,7	1,2
6	0,5	0,5
7	0,5	0,9
8	0,5	0,5
9	0,5	0,9
10	0,5	0,5
11	0,5	0,7
12	0,5	1,7
13	0,5	0,5
14	0,6	0,7
15	0,5	0,6
16	0,5	0,6
17	0,5	1,5
18	0,5	0,8
19	11,8	0,9
20	0,5	0,8
21	0,5	0,6
22	0,5	2,2
23	0,5	2,6
24	0,5	9,9
25	0,5	0,5
26	0,5	0,5
27	0,5	0,9
28	0,5	0,6
29	0,5	13,3
30	0,5	1,1
31	0,5	1,3
32	0,5	1,9
33	0,6	0,6
34	0,5	1,9
35	0,5	1,0
36	0,5	0,7
37	0,5	1,9
38	0,5	1,6
39	0,5	1,3
40	0,5	0,6
média	0,9	1,5
desvio padrão	1,9	2,4

## 7 Conclusões

Após 4 meses de engarrafamento, o d<sub>5</sub>-TCA presente no centro das rolhas de cortiça natural artificialmente contaminadas não migrou através das células de cortiça para o vinho. Contudo, o interior das rolhas, continua muito contaminado.

Após 6 meses de conservação, a atmosfera dos frascos continua fortemente contaminada com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP. A solução hidroalcoólica vedada com Nomacorc apresenta-se contaminada com d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, assim como todo o corpo do vedante. As soluções hidroalcoólicas vedadas com rolhas de cortiça não se encontram contaminadas. Contudo, enquanto o vedante Neutrocork sorve todos os contaminantes no primeiro terço, o segundo terço (parte intermédia) da rolha natural já apresenta alguma contaminação de d<sub>5</sub>-TCA.

Durante os 6 primeiros meses de engarrafamento, observou-se uma evolução das propriedades químicas e sensoriais do vinho branco. Esta evolução traduziu-se por uma redução das concentrações de SO<sub>2</sub> livre e total conjuntamente com um aumento da absorvância a 420 nm. Estas modificações foram significativamente mais importantes no ensaio realizado a temperatura mais elevada e independente do tipo de vedante utilizado. Este ensaio apresenta também concentrações inferiores de compostos aromáticos responsáveis pelo aroma frutado no vinho, nomeadamente os ésteres de etilo e os ésteres acetatos. Sensorialmente, vinho conservado a temperaturas mais elevadas foi identificado como estando mais evoluído/oxidado, apresentando uma maior incidência de defeitos aromáticos.

Após 24 horas de conservação, o tratamento Acquamark não apresentou barreira à migração de 2,4,6-TCA das rolhas naturais para a solução hidroalcoólica, no entanto, dada a escassez de pontos de análise, este resultado ainda não é conclusivo.

## 8 Avaliação do trabalho realizado

### 8.1 Objectivos realizados

O facto do período de estágio ser de apenas 5,5 meses, impediu a análise a todos os pontos de ensaio dos diferentes projectos. Assim, no estudo da hipotética migração de TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho analisaram-se os pontos referentes aos meses 1 e 4 após engarrafamento; no estudo da susceptível migração de compostos atmosféricos (TCA e TCP) através de diferentes tipos de vedantes analisaram-se os pontos referentes 3 e 6 meses de conservação; no estudo sobre o envelhecimento de um vinho vedado com diferentes tipos de vedantes sob condições de evolução normal e acelerada, por imposição de aumento da temperatura analisou-se o ponto referente aos 6 meses após engarrafamento; no estudo do efeito barreira do Acquamark em rolhas de cortiça à passagem do TCA apenas se analisou o primeiro ponto.

### 8.2 Outros trabalhos realizados

No período de estágio que durou 5,5 meses, paralelamente aos projectos realizados, houve colaboração com a equipa do laboratório de controlo de qualidade do departamento I & D da Amorim & Irmãos. Cooperou-se na rotina diária de trabalho e em outros projectos dos investigadores do departamento.

Houve também a realização de um estágio de 3 dias na empresa De Sousa, onde foi dada formação sobre o processo de produção da rolha técnica Neutrocork e Twin-top desde a chegada da matéria-prima (granulado) à formação do produto final.

### 8.3 Limitações e trabalho futuro

Todos estes projectos foram planeados para longos tempos de duração, não tendo sido possível concluir durante a duração do estágio, qualquer um deles. Assegurou-se no entanto, a continuidade dos mesmos por parte da empresa.

No estudo da susceptível migração de compostos atmosféricos (TCA e TCP) através de diferentes tipos de vedantes existe a necessidade de alargar o estudo a outros vedantes, nomeadamente cápsulas de rosca e outros tipos de vedantes sintéticos, realizando contaminações mais reais, alargando também a outros tipos de contaminantes, tais como TeCA, PCA e TBA.

Relativamente ao projecto sobre o envelhecimento de um vinho vedado com diferentes tipos de vedantes, existe a necessidade de trabalhar o método para obter resultados mais consistentes.

#### 8.4 Apreciação final

Para a indústria corticeira, é essencial compreender os mecanismos de contaminação do vinho por cloroanisóis. A migração de contaminantes atmosféricos pelos vedantes sintéticos Nomacor Classic até à solução hidroalcoólica engarrafada põe em causa a sua designação de vedante. Este facto dá à indústria corticeira um argumento de grande relevância para as vantagens comparativas das rolhas de cortiça.

Este trabalho, no que diz respeito ao estudo do envelhecimento acelerado de um vinho permitirá ao departamento I & D da Amorim & Irmãos dispor de um método de validação mais rápida dos seus produtos.

## 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).
- 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).
- Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Barker, D. A., McLean, H. J., Pollnitz, A. P. e 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).
- Capone, D. L., Skouroumounis, e 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).
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. e 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 control. Fundación para la Cultura del Vino. (ed.). Pag. 9-19. Madrid, Espanha, 52, Chapter 1 Introduction (2004).
- Conrad, L. S., Sponholz, W. R. e Berker, O., Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme. Patent No. WO 9958309 (1999).
- 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 Environment 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).
- Cserjesi, A. J. e Johnson, E. L., Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*, *Can. J. Microbiol*, 18, 45-49 (1972).
- Curtis, R. F., Dennis, C., Gee, J. M., Griffiths, M. N., Land, D. G., Peel, J. L. e Robinson, 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).

- Fortes, M. A., Rosa, M. E., Pereira, H., A cortiça, 2<sup>a</sup> ed, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal (2006).
- Francis, L., Field, J., Gishen, M., Valente, P., Lattey, K., Hoj, P., Robinson, E. e Godden, P., The AWRI closure trial: sensory evaluation data 36 months after bottling, Aust. And NZ Grapegrower Winemaker. 475, 59-64 (2003).
- Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., Hoj, P., Robinson, E., Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine 1. Performance up to 20 months post-bottling, Australian J. of Grape and Wine Research, 7, 64-105 (2001).
- Godden, P., Lattey, K., Francis, L., Gishen, M., Cowey, G., Holdstock, M., Robinson, E., Waters, E., Skouroumounis, G., Sefton, M., Capone, D., Kwiatkowski, M., Field, J., Coulter, A., D'Costa, N., Bramley, B., Towards offering wine to the consumer in optimal condition – the wine, the closures and other packaging variables. A review of AWRI research examining the changes that occur in wine after bottling, Wine Ind. J., 20, 20-30 (2005).
- Jägger, J., Microwave treatment of cork and corks, Patent No. WO 9937334 (1999).
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P., Main route of oxygen ingress through different closures into wine bottles, J. Agric. Food Chem., 55, 5167-5170 (2007).
- Lopes, T., Estudos de Migração de 2,4,6-tricloroanisol através de vedantes., Tese de Mestrado Integrado, FEUP, Portugal (2008).
- Oliveira, J. M., Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho., Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Portugal (2000).
- Mas, A., Puig, J., Llado, N., Zamora, F., Sealing and storage position on wine evolution., J. Food Sci., 67, 1374-1378 (2002).
- Peña-Neira, A., Fernández de Simón, B., Garcia-Vallejo, M. C., Hernández, T., Cadahía, E., e Suarez, J. A., Presence of cork taint responsible compounds in wines and their cork stoppers, European Food Research and Technology, 211, 257-261 (2000).
- Peynaud, E., Conhecer e trabalhar o vinho, 2<sup>a</sup> ed., Litexa editora, Lda., Lisboa, Portugal (1993).
- Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K. e 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).
- Ribéreau-Gayon, J., Dissolution d'oxygène dans les vins. Contribution à l'étude des oxidations et reductions dans les vins. Application à l'étude de vieillissement et des cases, 2<sup>nd</sup> ed, Delmas: Bordeaux, france, 35 pp (1933).
- Sampaio, J., Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes., Tese de Mestrado Integrado, FEUP, Portugal (2008).

- Sefton, M. A. e Simpson, R. f., Compounds causing cork taint and the factors affecting they transfer from natural cork closures to wine – a review., *Aus. J. Grape Wine Res.*, 11, 226-240 (2005).
- Simpson, R. F., Capone, D. L., Duncan, B. C. e 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).
- Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D., Duncan, B., Sefton, M., A., Waters, E. J., The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavor properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage., *Aust. J., Grape Wine Res.*, 11, 369-384 (2005).
- Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T., e Goldberg, D. M., Method for the gas chromatographic assay with mass selective 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).
- Taylor, M. K., Young, T. M., Butzke, C. E. e Ebeler, S. E., Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2208-2211 (2000).
- Waters, E. J., Peng, Z., Pocock, K. F., Williams, P. J., The role of corks in oxidative spoilage of white wines., *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2, 191-197 (1996).

## 9 Anexos

### A: Estudos de migração de 2,4,6-Tricloroanisol através de vedantes

#### 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 extracção, a microextracção em fase sólida – SPME (Solid Phase Microextraction), com um método analítico suficientemente sensível, a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS).

A microextracção em fase sólida, desenvolvida por Pawliszyn et al., (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.

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.

Após o processo de extracção, os compostos são analisados por cromatografia gasosa, onde estes são termicamente desorvidos para a coluna cromatográfica sob fluxo do gás de arrasto.

#### 1.1. Equipamento e Reagentes

##### Equipamento

- Cromatógrafo Gasoso: Agilent 6890
- Detector: Espectroscopia de Massa Agilent 5973
- Auto-Sampler: Gerstel MPS2, n<sup>o</sup> série 121694
- Programa de aquisição de dados: Enhanced Chemstation, G1701 CA Version C.00.00 21-Dec-1999, Copyright © Agilent Technologies 1989-1999

##### Material e Reagentes

- Vinho branco, 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 d<sub>5</sub>-TCA – colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 mL a rolha (ou pedaço de rolha) que se pretende analisar o nível de d<sub>5</sub>-TCA, completar o volume do mesmo com solução hidroalcoólica a 12 %. 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 <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP – colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 mL a rolha (ou pedaço de rolha) que se pretende analisar o nível de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-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 d<sub>5</sub>-TCA e de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP, faz-se a maceração com carbonato de potássio.

- Padrão interno: 100 µg/L d<sub>5</sub>-TBA em solução hidroalcoólica a 12 % em água destilada, com concentração de 100 µL/L
- Agente de derivatização: 20 µg/L 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 0,20 mm, 0,25 µm ID DF = 0,33t, referência CP8935

## 1.2. Preparação de amostras para análise no GC/MS

### Quantificação do d<sub>5</sub>-TCA

Amostras Líquidas – Vinho ou solução de maceração

Pipetar 10 mL da solução a analisar para vials de 20 mL com fechadura screw-caps munidas de um septum, contendo aproximadamente 2 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido. Adicionar 100 µL de padrão interno, d<sub>5</sub>-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 <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP

Amostras Líquidas

- Solução de maceração

Pipetar 10 mL da solução a analisar para vials de 20 mL com fechadura de cápsulas magnéticas munidas de um septum, contendo aproximadamente 2 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido. Adicionar 100 µL de padrão interno, d<sub>5</sub>-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 a 13,8 g/L antes de capsular.

Amostras Gasosas – Análise dos níveis de d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-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 min. Após 20 min, recolher a fibra e só depois retirar a seringa. Devido ao facto do composto <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP ser menos volátil, torna-se necessário recorrer ao método de derivatização:

- Num vial (capacidade 20 mL) colocar 200 µL de Anidrido Ácido Acético de concentração 100 µL (10 mL)<sup>-1</sup>. Injectar a seringa no vial e expor a fibra num total de 10 min. Retirar a fibra e só depois a seringa.

### 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 interesses. Como o cromatógrafo é um equipamento muito sensível torna-se necessário efectuar várias rectas de calibração.

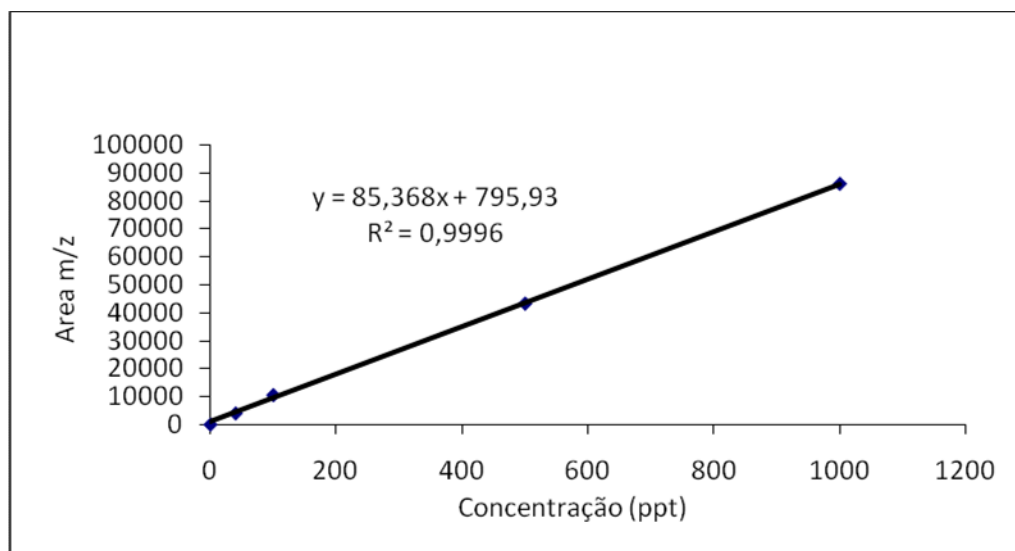


Figura A.1: Recta de calibração para o composto d<sub>5</sub>-TCA [0-1000] ng/L, com padrão interno d<sub>5</sub>-TBA 100 µg/L

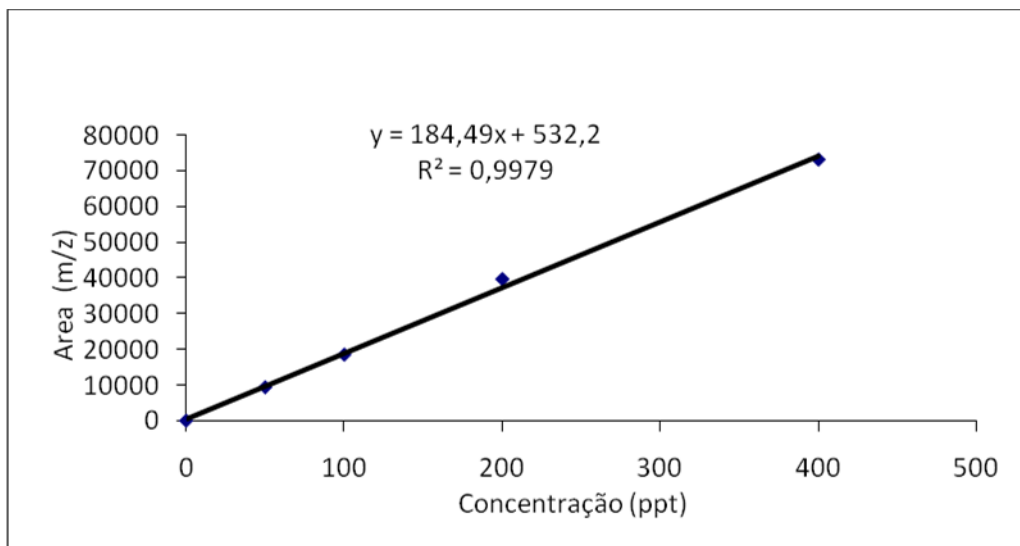


Figura A.2: Recta de calibração para o composto d<sub>5</sub>-TCA [0-400] ng/L, com padrão interno d<sub>5</sub>-TBA 100 µg/L

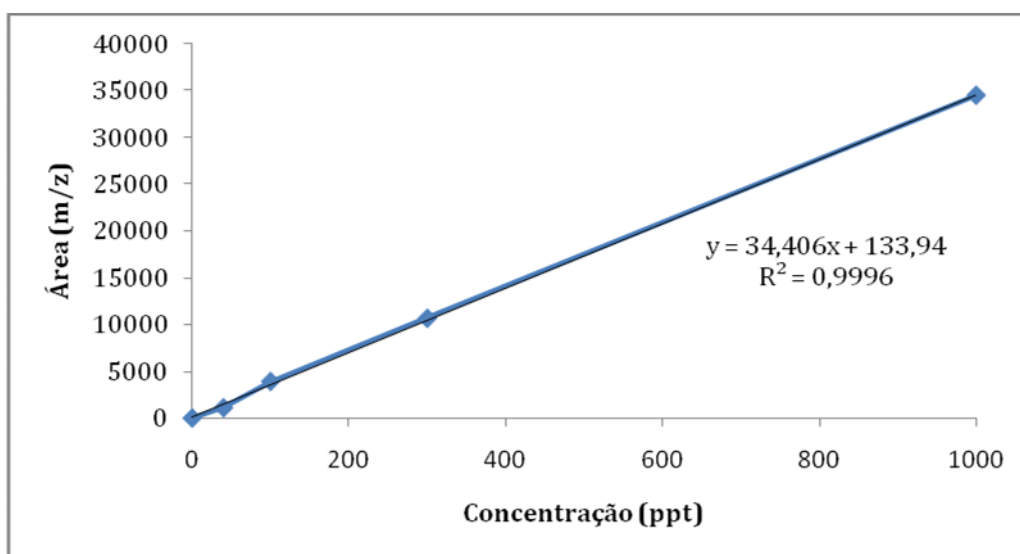


Figura A.3: Recta de calibração para o composto d<sub>5</sub>-TCA [0-1000] ng/L, com padrão interno d<sub>5</sub>-TBA 100 µg/L

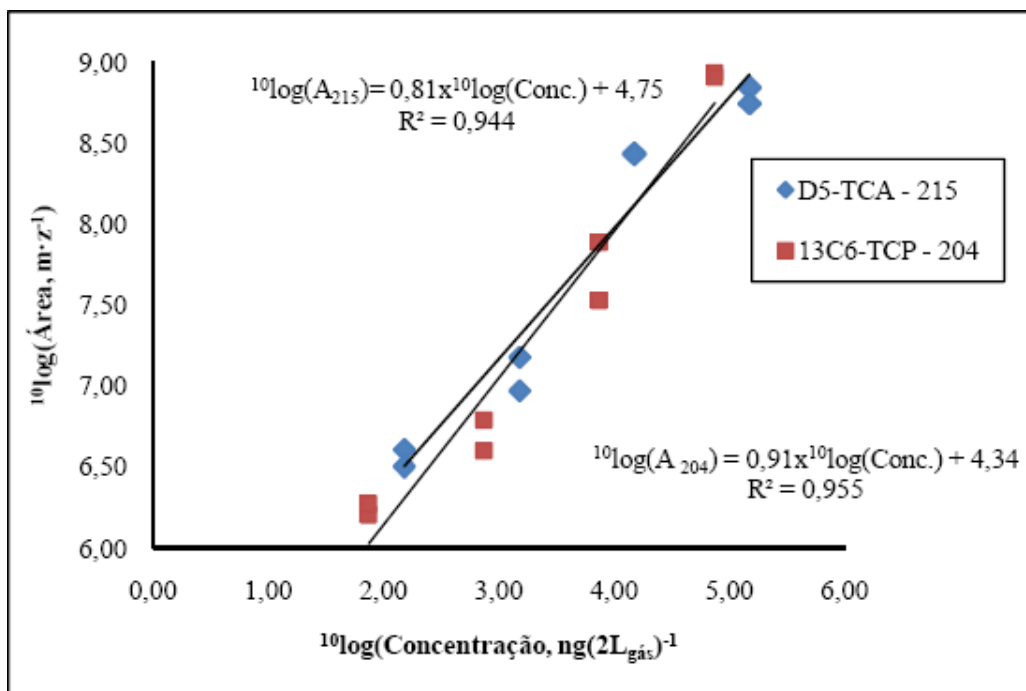


Figura A.4: Recta de calibração para os compostos d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP atmosféricos (adaptado de Lopes, 2008)

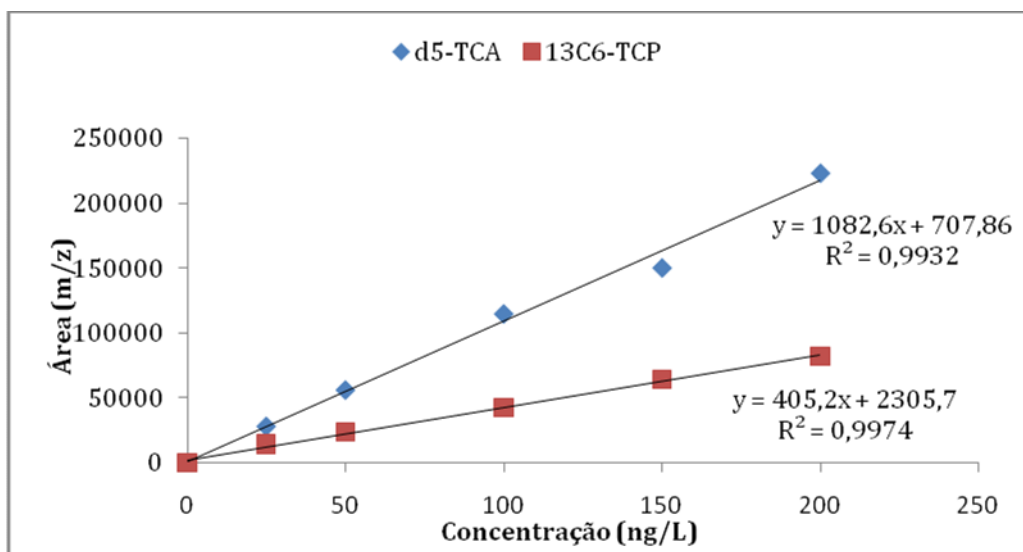


Figura A.5: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-200] ng/L em solução de EtOH

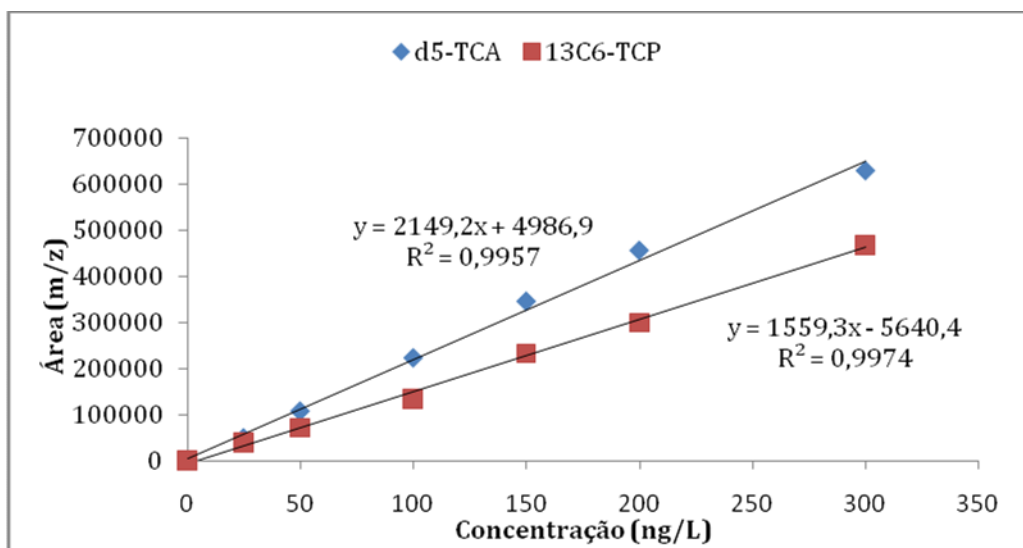


Figura A.6: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-300] ng/L em solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

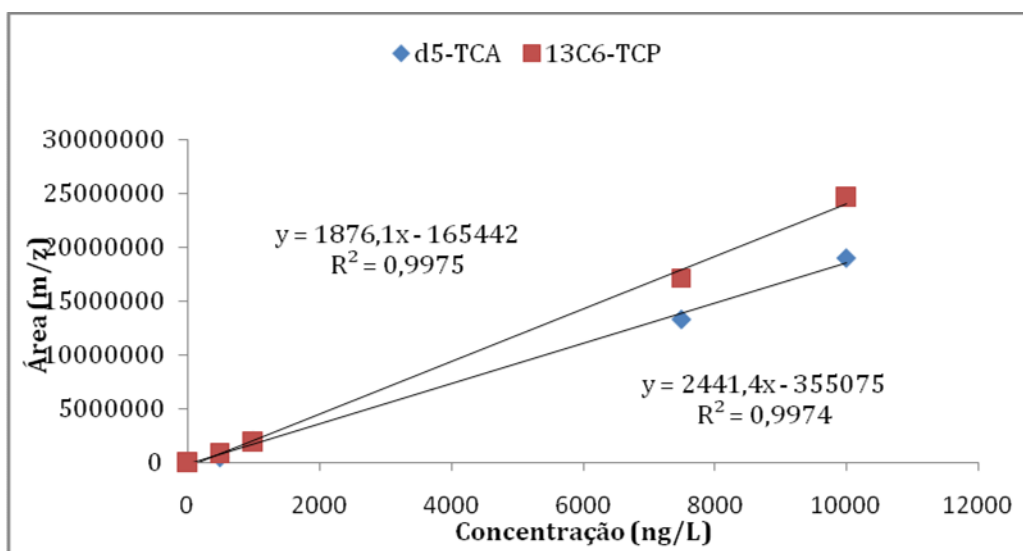


Figura A.7: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-10000] ng/L em solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

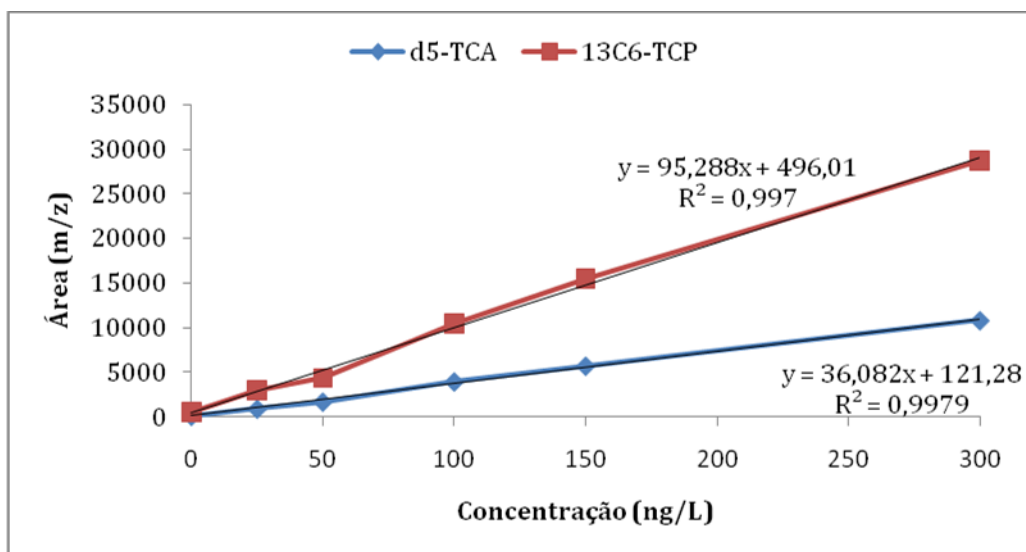


Figura A.8: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-300] ng/L em solução de EtOH

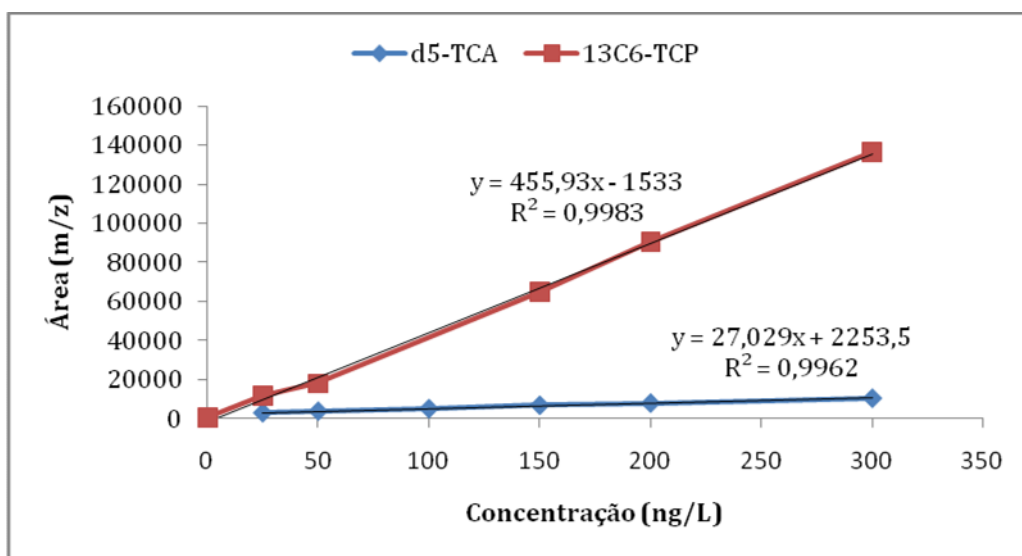


Figura A.9: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-300] ng/L em solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

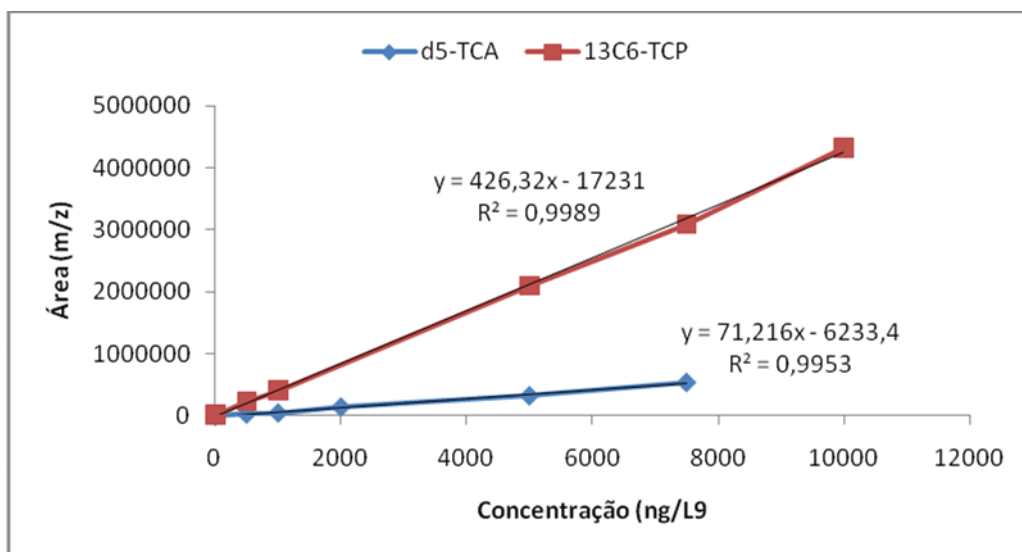


Figura A.10: Recta de calibração para o d<sub>5</sub>-TCA [0-7500] ng/L e <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCP [0-10000] ng/L em solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### 1.3.1. Tratamento dos resultados do GC/MS

- Para recalcular a área de d<sub>5</sub>-TCA (A d<sub>5</sub>-TCA\*) é necessário usar a seguinte fórmula:

$$A_{d5-TCA*} = \frac{\overline{A_{p.i.}}}{A_{p.i.}} \times A_{d5-TCA}$$

Legenda:

- $\overline{A_{p.i.}}$  - Média da área do padrão interno dos pontos da recta de calibração
- $A_{p.i.}$  - Valor da área do padrão interno da respectiva amostra
- $A_{d5-TCA}$  - 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:

$$A_{d5-TCA^*} = m \times C_{d5-TCA} + b$$

Logo, a concentração vem dada por:

$$C_{d5-TCA} = \frac{A_{d5-TCA^*} - b}{m}$$

Legenda:

- $A_{d5-TCA^*}$  - área recalculada
- b - valor da ordenada na origem da recta de calibração
- m - valor do declive da recta de calibração

#### 1.4. Controlo do perfil do gargalo

O controlo do gargalo das garrafas utilizadas no ensaio realizou-se na Amorim Distribuição

**Código Ensaio:** 285/07

**Tipo de Garrafa:** Bordalesa 37.5 cL

**Fornecedor:** Vidrala

**Profundidade:** 54 mm

**Dist. Topo:** 3 mm

**Resolução:** 2mm

Tabela A.1: Características do gargalo das garrafas utilizadas em ambos os estudos (adaptado de Lopes, 2008)

<b>Prof</b>	<b>0 Graus</b>	<b>90 Graus</b>	<b>Média</b>	<b>Ovalidade</b>	<b>Conicidade</b>
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	19,08	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	18,48	20,07	18,78	0,58	0,86
18,0	20,24	20,77	20,51	0,53	1,69
20,0	20,73	21,29	21,01	0,56	2,18
22,0	20,88	21,39	21,13	0,53	2,31
24,0	20,97	21,39	21,13	0,52	2,31
26,0	20,88	21,39	21,14	0,51	2,32
28,0	20,91	21,39	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	0,28	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	21,38	21,32	21,34	0,04	2,52
46,0	21,80	21,35	21,48	0,25	2,66
48,0	21,93	21,45	21,89	0,48	2,87
50,0	22,35	21,84	22,00	0,71	3,18
52,0	22,98	21,94	22,41	0,94	3,59
54,0	23,53	22,37	22,85	1,16	4,13

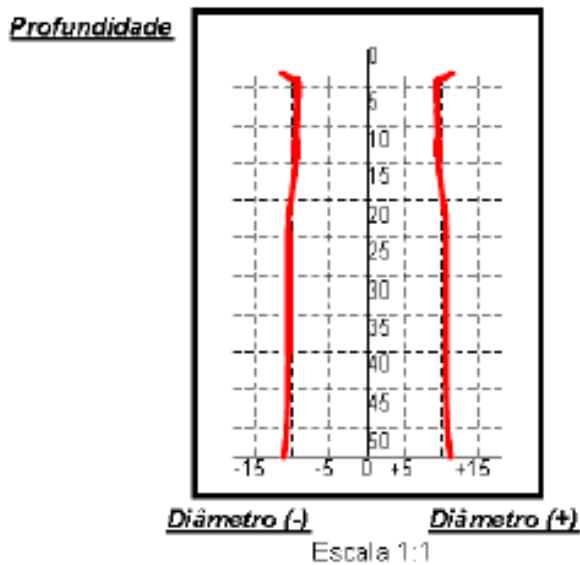


Figura A.11: Esquema do perfil do gargalo em termos de profundidade (adaptado de Lopes, 2008).

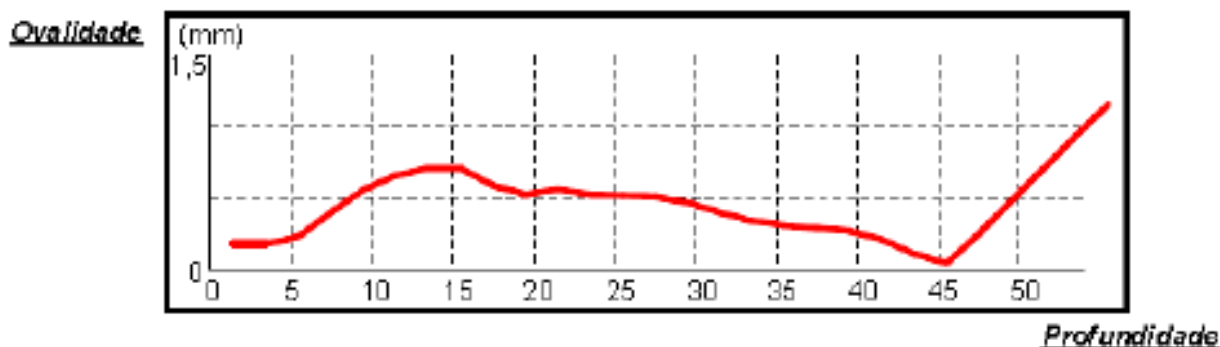


Figura A.12: Esquema do perfil do gargalo em termos de ovalidade (adaptado de Lopes, 2008).

## 2. Método de análise: ECD

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

A microextracção em fase sólida, desenvolvida por Pawliszyn et al., (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.

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.

Após o processo de extracção, os compostos são analisados por cromatografia gasosa, onde estes são termicamente desorvidos para a coluna cromatográfica sob fluxo do gás de arrasto.

### 2.1. Equipamento e Reagentes

#### Equipamento

- Cromatógrafo Gasoso: Varian CP 3800
- Detector: Captura electrónica
- Auto-Sampler: Combi Pal
- Programa de aquisição de dados: Galaxie

## Material e Reagentes

- 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 2,4,6-TCA – colocar num frasco de vidro com capacidade de 60mL a rolha que se pretende analisar o nível de 2,4,6-TCA, completar o volume do mesmo com solução hidroalcoólica a 12 %. Cobrir o frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa. Deixar em maceração à temperatura ambiente.
- Padrão interno: 100 µg/L 2,3,6-TCA em solução hidroalcoólica a 12 % em água destilada, com concentração de 20 µL/L
- Fibra Sigma-Aldrich Co., com 100 µm de um revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS)
- Coluna: Varian, FactorFour™ Capillary Column VF-5ms 30 m x 0,32 mm, ID DF = 0,25 CP8955

## 2.2. Preparação de amostras para análise no ECD

### Quantificação do 2,4,6-TCA

Amostras Líquidas – solução de maceração

Pipetar 10 mL da solução a analisar para vials de 20 mL com fechadura de cápsulas magnéticas munidas de um septum, contendo aproximadamente 2 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido. Adicionar 100 µL de padrão interno, 2,3,6-TCA 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 ECD, seleccionar o método e colocar o programa a decorrer utilizando o auto-sampler com aquecimento e agitação.

## 2.3. 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 interesses.

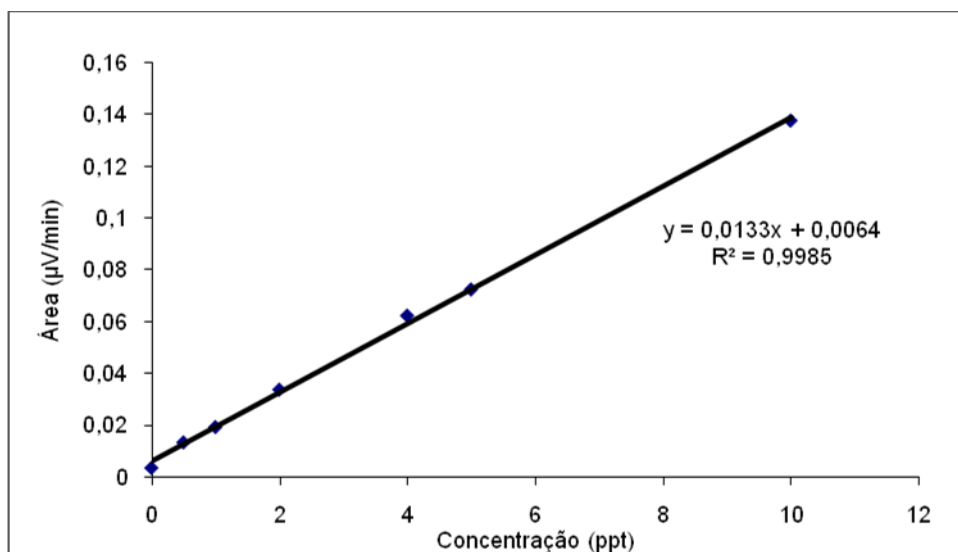


Figura A.13: Recta de calibração para o composto 2,4,6-TCA [0-10] ng/L, com padrão interno 2,3,6-TCA 100 µg/L

#### 2.4. Tratamento dos resultados

O tratamento dos resultados no ECD é igual ao tratamento dos resultados no GC/MS.

## B – Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes

### 1. Especificações

#### 1.1. Vedantes

##### 1.1.1. Rolhas de Cortiça Natural

Tabela B.1 – Características das rolhas naturais utilizadas no projecto, obtidas pelo Medcork (adaptado de Sampaio, 2008).

<i>Rolhas Naturais</i>								
'Rolha'	'Compr'	Expr<3>	Expr<4>	'D MÚdio'	'Ovalid'	Corpo	Massa	'Massa Vol Apar'
1	38,19	24,17	24,21	24,19	0,04	4,3	3,33	189,7286
2	37,75	23,83	23,97	23,9	0,14	4,3	3,05	180,0931
3	37,97	24,39	24,4	24,4	0,01	4,4	3,07	172,9132
4	38,19	24,18	24,16	24,17	0,02	4,4	2,91	166,0733
5	38,14	24,32	24,06	24,19	0,26	4,5	2,73	155,7471
6	38,13	23,96	23,78	23,87	0,18	5,2	2,73	159,993
7	37,9	23,98	23,86	23,92	0,12	4,7	2,93	172,0347
8	38,16	24,23	24,16	24,2	0,07	4,4	3,04	173,1986
9	38,22	23,73	24,16	23,95	0,43	4,9	3,24	188,1713
10	38,22	24,1	24,15	24,13	0,05	4,3	2,51	143,6079
11	38	24,26	23,88	24,07	0,38	4,3	3,14	181,595
12	37,61	23,85	23,7	23,78	0,15	4,6	2,57	153,8566
13	38,19	24,02	24,2	24,11	0,18	5,1	2,76	158,2978
14	37,22	23,99	24,11	24,05	0,12	4,9	2,3	136,029
15	38,2	23,89	23,95	23,92	0,06	4,3	3,16	184,082
16	38,2	23,89	23,94	23,92	0,05	4,3	2,63	153,2075
17	38,03	24,21	24,34	24,28	0,13	4,5	2,82	160,1532
18	38,15	23,96	23,58	23,77	0,38	4,6	3,05	180,1594
19	38,15	23,98	23,7	23,84	0,28	4,4	3,13	183,8008
20	38,21	24,13	23,91	24,02	0,22	4,5	2,61	150,7396
21	37,86	23,73	23,58	23,66	0,15	4,5	2,83	170,0147
22	38,08	23,87	23,91	23,89	0,04	4,4	2,61	152,9049
23	38,23	24,18	24,25	24,22	0,07	4,3	3,06	173,7316
24	38,24	23,79	23,5	23,65	0,29	4,8	3,26	194,0651
25	38,14	24,11	24,21	24,16	0,1	4,3	3,11	177,8672
26	38,19	24,06	24,12	24,09	0,06	4,2	2,58	148,2199
27	38,02	23,87	24,17	24,02	0,3	4,3	3,43	199,0884
28	38,21	23,92	23,92	23,92	0	4,3	2,8	163,068
29	38,18	24,37	24,15	24,26	0,22	4,3	2,5	141,6552
30	38,26	24,06	24,06	24,06	0	4,5	2,95	169,5882
31	37,96	23,8	23,72	23,76	0,08	4,5	2,58	153,2889
32	38,23	24,11	24,13	24,12	0,02	4,7	2,9	166,0157
33	38,24	24,16	23,85	24,01	0,31	4,3	2,81	162,2983
34	38,16	24,15	24,2	24,18	0,05	4,2	2,54	144,9514
35	37,83	24,22	23,88	24,05	0,34	4,5	2,6	151,2923
36	37,96	24,01	24,03	24,02	0,02	4,3	3,49	202,8912
37	38,08	23,94	23,85	23,9	0,09	4,5	2,28	133,4603
38	38,22	24,16	24,34	24,25	0,18	4,4	3,23	182,9778
39	38,12	24,07	24,1	24,09	0,03	4,5	3,11	178,9962
40	38,12	24,06	24,02	24,04	0,04	4,6	2,47	142,7529
41	37,86	23,93	23,9	23,92	0,03	4,7	2,32	136,3626
42	38,02	23,88	24,5	24,19	0,62	4,3	3,04	173,9802
43	37,82	23,9	23,83	23,87	0,07	4,8	2,9	171,349
44	38,25	24,28	24,28	24,28	0	4,4	4,47	252,3996
45	38,36	24,14	24,25	24,2	0,11	4,8	3,04	172,2957
46	38,07	24,18	23,99	24,09	0,19	4,4	2,99	172,3157
47	38,12	23,96	24,12	24,04	0,16	4,2	2,99	172,8062
48	38,1	24	24,07	24,04	0,07	4,5	2,87	165,9579
49	38,15	24,09	23,73	23,91	0,36	4,4	2,62	152,9529
50	38,25	24,07	23,88	23,98	0,19	4,6	2,75	159,1889
51	38,09	24,16	24,27	24,22	0,11	4,3	2,6	148,1576
52	37,96	23,6	23,38	23,49	0,22	4,7	3,85	234,0338
53	38,16	24,09	24,08	24,09	0,01	4,3	3,05	175,359
54	38,2	24,01	24,15	24,08	0,14	4,3	2,92	167,8481

*Rolhas Naturais*

'Rolha'	'Compr'	Expr<3>	Expr<4>	'D MÚdio'	'Ovalid'	Corpo	Massa	'Massa Vol Apar'
55	38,12	24,13	23,93	24,03	0,2	4,6	2,67	154,4404
56	38,07	24,12	23,76	23,94	0,36	4,5	3,29	191,9882
57	38,05	23,92	24,13	24,03	0,21	4,6	3,7	214,4123
58	38,26	24,19	24,1	24,15	0,09	4,3	3,3	188,2976
59	38,15	24,13	23,98	24,06	0,15	4,5	2,79	160,8527
60	38,04	24,14	24,07	24,11	0,07	4,4	2,65	152,5882
61	37,95	24,05	24,2	24,13	0,15	4,4	2,73	157,3063
62	37,88	23,94	23,68	23,81	0,26	4,3	2,63	155,9326
63	38,14	24,24	23,86	24,05	0,38	4,4	3,48	200,853
64	40,05	23,97	24,07	24,02	0,1	4,4	2,74	150,9774
65	37,93	24,09	23,89	23,99	0,2	5	2,51	146,3998
66	38,08	23,99	23,98	23,99	0,01	4,4	3,03	176,0334
67	37,93	23,87	24,3	24,09	0,43	4,6	2,8	161,9614
68	37,79	23,55	23,71	23,63	0,16	4,4	2,46	148,4366
69	38,21	24,19	24,25	24,22	0,06	4,3	3,06	173,8225
70	38,19	24,16	23,7	23,93	0,46	4,5	3,17	184,5585

*Legenda*

	Colocadas na Garrafeira (Champcork) a cerca de 18°C
	Colocadas na Estufa (I&D) a cerca de 25°C
	Sairam das garrafas colocadas inicialmente na Estufa (I&D) a cerca de 30°C

## 1.1.2. Rolhas Técnicas Neutrocork

Tabela B.2 – Características das rolhas Neutrocork utilizadas no projecto, obtidas pelo Medcork (adaptado de Sampaio, 2008).

<i>Rolhas Neutrocork</i>								
'Rolha'	'Compr'	'Expr<3>	'Expr<4>	'D MÚdio'	'Ovalid'	'Corpo'	'Massa'	'Massa Vol Apar'
1	37,82	23,94	23,89	23,92	0,05	5,2	4,56	268,3063
2	38,14	23,89	23,88	23,89	0,01	5,7	5,06	295,9699
3	37,74	23,86	23,78	23,82	0,08	5,7	4,75	282,4348
4	37,95	23,91	23,91	23,91	0	5,5	4,79	281,1089
5	37,77	23,91	23,9	23,91	0,01	5,1	4,79	282,4486
6	37,81	23,79	23,79	23,79	0	5,2	4,89	290,9533
7	38,07	23,93	24	23,97	0,07	5,6	4,86	282,8964
8	37,83	23,75	23,72	23,74	0,03	5,1	5,03	300,3864
9	38,13	23,98	23,97	23,98	0,01	6,1	4,89	283,9578
10	38,14	24	24	24	0	5,8	4,73	274,1373
11	37,73	23,9	23,89	23,9	0,01	5,2	4,67	275,8953
12	37,81	23,79	23,77	23,78	0,02	5,8	4,91	292,389
13	37,98	23,89	23,89	23,89	0	5,1	4,97	291,9303
14	37,86	23,86	23,84	23,85	0,02	5,1	4,82	284,9704
15	38,14	24,07	24,11	24,09	0,04	5,6	4,75	273,2432
16	37,92	23,87	23,85	23,86	0,02	5,8	5,08	299,6157
17	37,77	23,95	23,9	23,93	0,05	5,3	4,99	293,7502
18	38,09	23,99	23,98	23,99	0,01	5,1	4,51	261,948
19	37,89	23,92	23,84	23,88	0,08	5,3	4,61	271,655
20	37,81	23,78	23,79	23,79	0,01	5,2	4,62	274,8885
21	37,81	23,85	23,86	23,86	0,01	5,1	4,77	282,1505
22	37,94	23,96	23,97	23,97	0,01	5,2	4,63	270,4318
23	37,62	23,75	23,75	23,75	0	5,5	4,56	273,608
24	38,11	24,06	24,05	24,06	0,01	5,8	4,78	275,872
25	37,85	23,83	23,8	23,82	0,03	5,4	4,75	281,614
26	37,92	23,89	23,89	23,89	0	5,6	4,86	285,9207
27	37,95	23,89	23,88	23,89	0,01	5,6	4,25	249,836
28	37,98	23,87	23,88	23,88	0,01	5,3	4,35	255,7265
29	37,9	23,82	23,82	23,82	0	5,3	4,9	290,1238
30	37,9	23,87	23,88	23,88	0,01	5,4	4,86	286,3112
31	38,05	24	24,02	24,01	0,02	5,1	4,81	279,2004
32	38,13	24,01	24,01	24,01	0	5,7	4,65	269,3468
33	38,21	24,11	24,11	24,11	0	5,2	4,93	282,6086
34	38,07	23,88	23,88	23,88	0	5,2	4,93	289,1382
35	38,03	23,99	23,99	23,99	0	5,5	4,92	286,2123
36	38,15	23,97	23,97	23,97	0	5,1	4,9	284,6266
37	37,75	23,73	23,74	23,74	0,01	5,1	4,91	293,8415
38	37,92	23,89	23,89	23,89	0	5,6	4,33	254,7401
39	37,86	23,88	23,88	23,88	0	5,7	4,56	268,9216
40	37,93	23,9	23,9	23,9	0	5,2	5,02	295,0088
41	37,86	23,86	23,86	23,86	0	5,7	4,67	275,8706
42	37,96	23,84	23,85	23,85	0,01	5,5	4,84	285,3989
43	37,78	23,88	23,87	23,88	0,01	5,1	4,55	268,9
44	37,93	23,92	23,92	23,92	0	5,3	4,31	252,8612
45	38,04	23,99	23,99	23,99	0	5,6	4,79	278,5765
46	38,13	23,97	23,98	23,98	0,01	5,5	5,43	315,3151
47	37,73	23,77	23,77	23,77	0	5,7	4,78	285,4912
48	38,03	23,96	23,96	23,96	0	5,8	4,77	278,1816
49	37,81	23,91	23,88	23,9	0,03	5,1	4,82	284,1545
50	37,68	23,77	23,74	23,76	0,03	5,2	4,76	284,9136
51	37,91	23,99	23,98	23,99	0,01	5,1	4,59	267,8603
52	38,05	24,02	24,03	24,03	0,01	5,7	4,7	272,3615
53	37,91	23,84	23,82	23,83	0,02	5,5	5,06	299,2669
54	37,69	23,82	23,84	23,83	0,02	5,5	4,86	289,1159

*Rolhas Neutrocork*

'Rolha'	'Compr'	Expr<3>	Expr<4>	'D MÚdio'	'Ovalid'	Corpo	Massa	'Massa Vol Apar'
55	37,96	23,81	23,9	23,86	0,09	5,1	5,11	301,0674
56	37,89	23,91	23,9	23,91	0,01	5,1	4,99	293,31
57	38,26	24,05	24,04	24,05	0,01	5,5	4,91	282,4986
58	37,66	23,74	23,75	23,75	0,01	5,3	4,61	276,3144
59	37,91	23,95	23,92	23,94	0,03	5,1	4,97	291,249
60	37,72	23,86	23,84	23,85	0,02	5,1	4,65	275,9399
61	37,98	23,89	23,97	23,93	0,08	5,5	4,83	282,7593
62	38,13	24,05	23,99	24,02	0,06	5,5	5,06	292,8517
63	37,66	23,78	23,77	23,78	0,01	5,1	4,75	283,9878
64	38,24	24,08	24,04	24,06	0,04	5,5	5,43	312,3207
65	37,74	23,84	23,76	23,8	0,08	5,3	4,93	293,6304
66	37,73	23,82	23,77	23,8	0,05	5,6	4,91	292,5167
67	38,13	24,07	24,04	24,06	0,03	5,8	4,61	265,9212
68	38,04	23,93	23,91	23,92	0,02	5,2	4,95	289,5692
69	38,01	23,93	23,93	23,93	0	5,8	4,48	262,0625
70	37,79	23,89	23,87	23,88	0,02	6	4,44	262,3297

*Legenda*

	Colocadas na Garrafeira (Champcork) a cerca de 18°C
	Colocadas na Estufa (I&D) a cerca de 25°C
	Garrafas que sobraram e foram aproveitadas para análise do vinho ao "tempo zero"

## 1.2. Vinho

### 1.2.1. Gazela

Gazela


SOGRAPE VINHOS

GAZELA

Branco

---

Vinho Verde DOC | Portugal



**O Vinho**

Gazela é um Vinho Verde de sabor suave, leve e refrescante, que sabe bem com a vida. Gazela é um vinho descomprometido, um clássico renovado, que confirma todo o potencial da região para criar vinhos leves e cativantes, ideais para o dia-a-dia.

**Notas de Prova**

Gazela tem uma cor amarelo citrino muito leve, com um ligeiro desprendimento de gás que realça os aromas, sabores e frescura do vinho. Aromático e cativante, Gazela alia às notas de citrinos e frutos tropicais uma acidez viva e estimulante, muito bem equilibrada pelo ligeiro sabor adamado. O resultado é um vinho simples, versátil e muito atractivo. Dada a sua frescura, Gazela é um vinho que ganha em ser consumido de imediato.

**Sugestões de Consumo**

Gazela é ideal para acompanhar saladas, pratos leves de peixe ou marisco, ou simples como aperitivo. Gazela deve ser servido bem fresco, em copo de vinho branco, a uma temperatura entre os 6º-8º C.

**Castas**

Gazela é um vinho de lote, produzido a partir de uvas seleccionadas das castas tradicionais do Vinho Verde, próprias e de lavradores privados. A casta predominante é o Loureiro, sendo utilizado em menor percentagem Arinto, Trajadura e Azal.

**Vindima e Vinificação**


Gazela é produzido na adega da Quinta de Azevedo, magnífica propriedade pertença da Sogrape junto a Barcelos, região dos Vinhos Verdes. As uvas colhidas à mão são desengaçadas e esmagadas suavemente. O mosto resultante é separado das películas em prensas pneumáticas e sujeito a decantação estática durante +/-24 horas, devidamente protegido de oxidações, até atingir o grau de limpidez desejado. Segue-se a fermentação em cubas de aço inox, sob uma temperatura controlada de aproximadamente 16º C.

**Maturação e Guarda**

Gazela é engarrafado imediatamente após a fermentação e lote, por forma a garantir toda a sua frescura inicial. Apesar de utilizar uma rolha longa, a garrafa de Gazela pode ser mantida de pé (devido ao seu ligeiro gaz), em local seco e fresco.

**Detalhes Técnicos**


Álcool: 9%	Acidez Total: c. 7,5 gr / lt. (ácido tartárico)	Açúcar: < 12 gr / lt.	pH: 3,1
------------	---	-----------------------	---------



SOGRAPE VINHOS  
"Si de um grande amor nasce grande vinho"  
"Wine of passion"

Figura B.1 – Informações Vinho Verde Branco, de marca Gazela (adaptado de Sampaio, 2008)

1.1.2. Garrafas

	<b>Controlo de Gargalos de Garrafas</b>		Data: 23-11-2007
	Champcork		Página 1
<b>Cód. Ensaio:</b>	<b>042/07</b>	<b>Cliente:</b>	I & D
<b>Garrafa:</b>	Bordalesa	<b>Fornecedor:</b>	Barbosa & Almeida
<b>Marca do Molde:</b>		<b>Operador:</b>	LUZ MAIA
<b>Profundidade:</b>	44 (mm) Dist. do Topo: 0 (mm)	<b>Resolução:</b>	2 mm
<b>Data :</b>	2007-Nov-23	<b>Responsável:</b>	_____
<b>Observações:</b>	Garrafas Lilases		

**Média das medidas a 0 e 90 Graus (mm)**

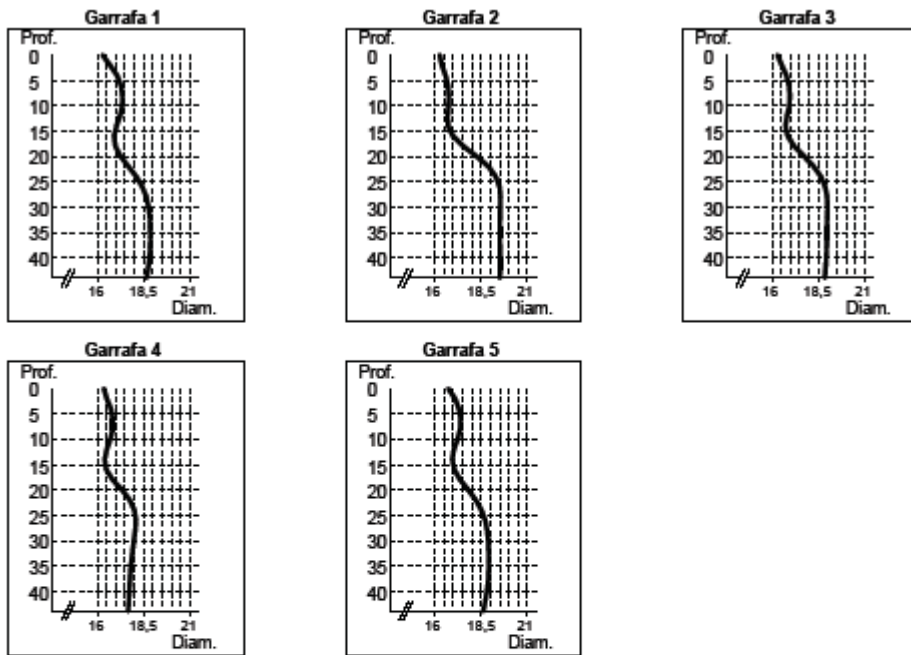
Prof.	G1	G2	G3	G4	G5
0,0	16,29	16,28	16,30	16,35	16,74
2,0	16,69	16,39	16,54	16,51	17,11
4,0	17,07	16,59	16,77	16,73	17,31
6,0	17,28	16,71	16,91	16,83	17,40
8,0	17,36	16,76	16,97	16,83	17,38
10,0	17,35	16,75	16,93	16,71	17,24
12,0	17,23	16,70	16,81	16,52	17,04
14,0	17,04	16,73	16,73	16,40	16,95
16,0	16,91	16,98	16,84	16,48	17,06
18,0	16,98	17,54	17,20	16,83	17,37
20,0	17,25	18,26	17,73	17,33	17,81
22,0	17,68	18,90	18,25	17,75	18,22
24,0	18,11	19,30	18,64	18,00	18,53
26,0	18,43	19,50	18,87	18,08	18,73
28,0	18,65	19,55	18,98	18,05	18,84
30,0	18,77	19,54	19,00	17,98	18,89
32,0	18,83	19,53	18,99	17,91	18,92
34,0	18,86	19,52	18,97	17,84	18,93
36,0	18,87	19,52	18,96	17,80	18,92
38,0	18,86	19,53	18,95	17,76	18,89
40,0	18,82	19,54	18,93	17,73	18,82
42,0	18,75	19,54	18,90	17,70	18,73
44,0	18,66	19,52	18,85	17,67	18,63

**Tabela Estatística «Média» (mm)**

Prof.	Média	Conicidade	D. Padrão	Mínimo	Máximo
0,0	16,39	0,00	0,19	16,26	16,78
2,0	16,65	0,26	0,27	16,36	17,18
4,0	16,89	0,50	0,28	16,57	17,40
6,0	17,02	0,63	0,29	16,71	17,51
8,0	17,06	0,67	0,29	16,76	17,50
10,0	17,00	0,61	0,28	16,67	17,46
12,0	16,86	0,47	0,28	16,45	17,35
14,0	16,77	0,38	0,26	16,34	17,17
16,0	16,85	0,46	0,26	16,44	17,21
18,0	17,18	0,79	0,32	16,79	17,56
20,0	17,68	1,29	0,42	17,04	18,31
22,0	18,16	1,77	0,49	17,48	19,03
24,0	18,52	2,13	0,51	17,93	19,48
26,0	18,72	2,33	0,52	17,98	19,72
28,0	18,81	2,42	0,53	17,94	19,78
30,0	18,84	2,45	0,55	17,85	19,77
32,0	18,83	2,44	0,57	17,76	19,74
34,0	18,82	2,43	0,59	17,68	19,72
36,0	18,81	2,42	0,60	17,63	19,71
38,0	18,79	2,40	0,62	17,58	19,72
40,0	18,77	2,38	0,63	17,55	19,73
42,0	18,72	2,33	0,64	17,52	19,74
44,0	18,66	2,27	0,64	17,49	19,73

Figura B.2 – Medidas dos perfis das garrafas utilizadas no projecto, obtidas pelo PerfilLab (adaptado de Sampaio, 2008).

**Desenho pormenorizado «Média» (mm) - Escala 1:1**



**Perfil do Gargalo «Média» (mm) - Escala 1:1**

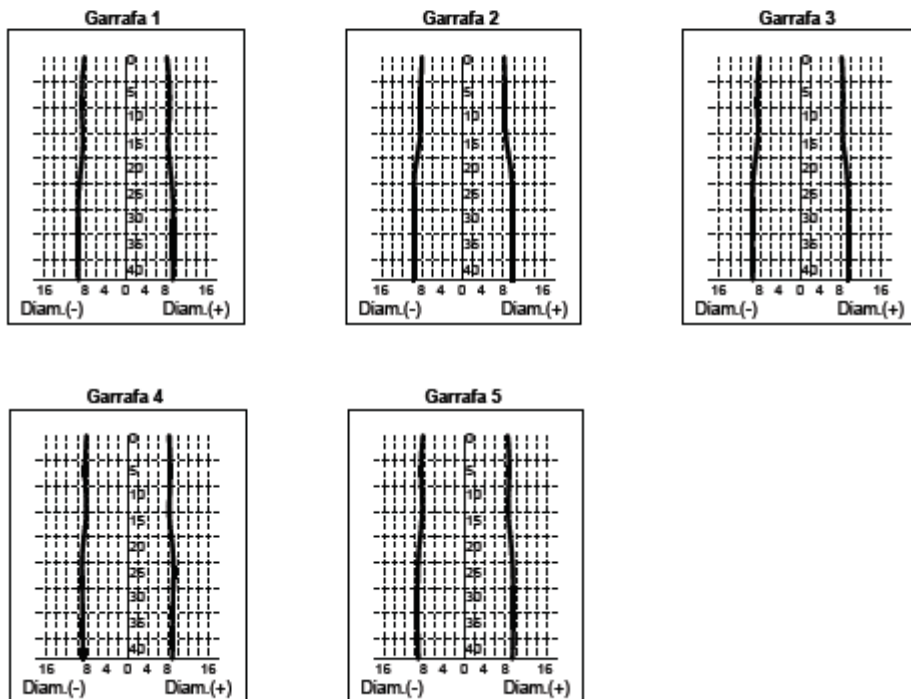


Figura B.3 – Perfis das garrafas utilizadas no projecto, obtidas pelo Perfilab (adaptado de Sampaio, 2008).

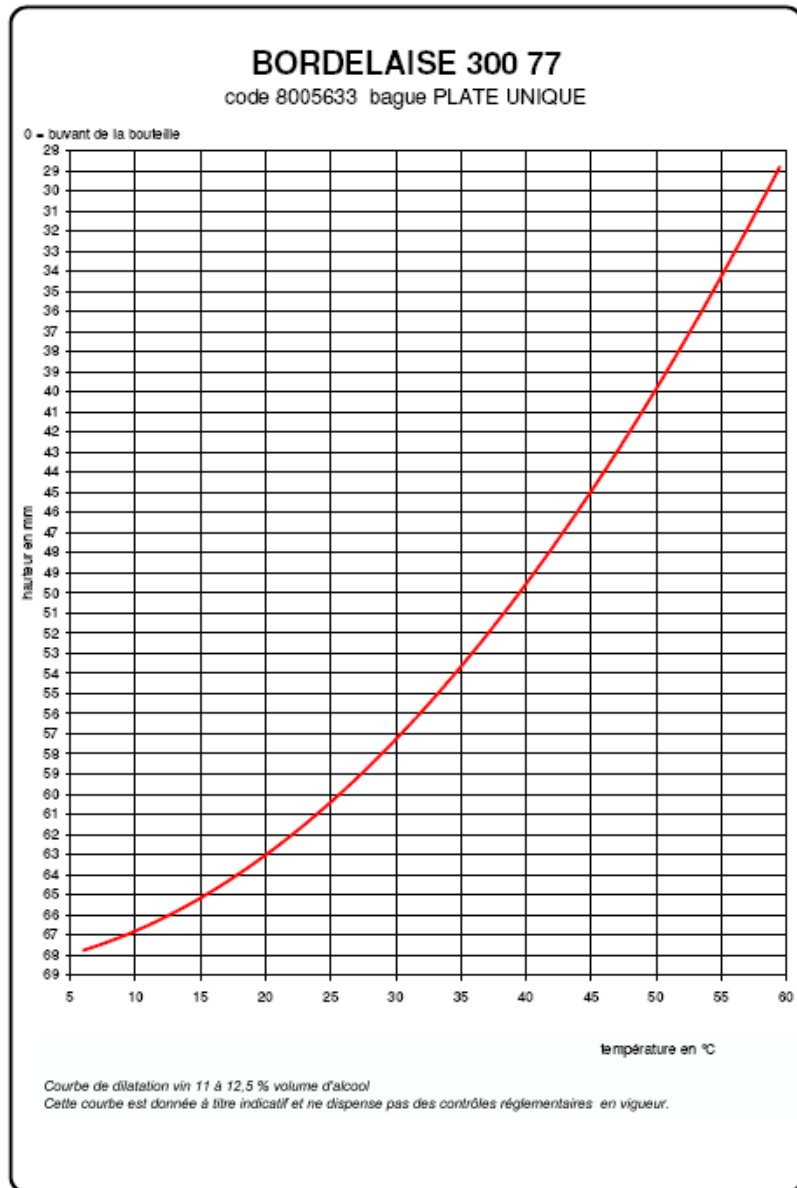


Figura B.4 – Curva de dilatação para de garrafa bordalesa (nível de enchimento vs. Temperatura) (adaptado de Sampaio, 2008).

### 1.3. Análise Sensorial

<b>Prova A</b>					
Nome: _____ Data: _____					
Apresentam-se três copos, numerados. Dois são idênticos, o outro diferente. Identifique o diferente.					
<p><b><u>Série 1</u></b></p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">1</td> <td style="width: 30%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">2</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">3</td> </tr> </table> <p>Qual lhe parece ser a diferença?</p>	1		2		3
1		2		3	
<p><b><u>Série 2</u></b></p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">4</td> <td style="width: 30%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">5</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">6</td> </tr> </table> <p>Qual lhe parece ser a diferença?</p>	4		5		6
4		5		6	
<p><b><u>Série 3</u></b></p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">7</td> <td style="width: 30%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">8</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">9</td> </tr> </table> <p>Qual lhe parece ser a diferença?</p>	7		8		9
7		8		9	
<p><b><u>Série 4</u></b></p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">10</td> <td style="width: 30%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">11</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">12</td> </tr> </table> <p>Qual lhe parece ser a diferença?</p>	10		11		12
10		11		12	
<p><b><u>Série 5</u></b></p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">13</td> <td style="width: 30%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">14</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 30%; padding: 5px;">15</td> </tr> </table> <p>Qual lhe parece ser a diferença?</p>	13		14		15
13		14		15	

Figura B.5 – Folha de prova da análise sensorial triangular realizada no ensaio aos dois meses

## 2. Exemplos de Cálculo

### 2.1. Padrão Interno

Exemplo de cálculo da concentração do composto Acetato de Etilo no padrão com 10 µL de cada composto e em 100 mL de etanol a 9 % v/v:

$$C_{EtilAcetato} (mg \cdot L^{-1}) = \frac{\rho_{EtilAcetato} (g \cdot mL^{-1}) \times V_{Padrão} (\mu L)}{V_{amostra} (\mu L) + V_{Padrão} (\mu L)} \times 1 \times 10^6 \quad (B.1)$$

$$C_{EtilAcetato} = \frac{0,902 \times 10}{100000 + 10} \times 1 \times 10^6 = 90,191 mg \cdot L^{-1}$$

Tabela B.3 – Massas Volúmicas dos compostos utilizados (Sigma Aldrich., 2007)

Compostos	$\rho/g \cdot mL^{-1}$
Acetato de Etilo	0,902
1-Propanol	0,804
Álcool de Isoamilo	0,809
Acetato de Isoamilo	0,876
Octanoato de Etilo	0,867
Decanoato de Etilo	0,862
Acetato de Fenetilo	1,032
Ácido Hexanóico	0,927
Benzaldeído	1,045

Para todos os padrões, integrou-se manualmente dos espectros, as áreas respectivas a cada composto. Com os valores da área e concentração, foi possível traçar a recta de calibração de cada composto, seleccionando os pontos, por um lado que davam melhor ajuste à recta e, por outro, consoante era de esperar aproximadamente a respectiva concentração presente no vinho.

A recta de calibração obtida para o Acetato de Etilo foi:

$$A_{\text{corrigida}}^1 \text{ média}(\text{EtilAcetato})(10^6) = 1,944 \times 10^{-1} \times C_{\text{EtilAcetato}}^1 \text{ média} - 1,146 \times 10^{-1} \quad (\text{B.2})$$

$$18,434 = 1,944 \times 10^{-1} \times C_{\text{EtilAcetato}}^1 \text{ média} - 1,146 \times 10^{-1} \Leftrightarrow C_{\text{EtilAcetato}}^1 \text{ média} = 95,415 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

## 2.2. Absorção e Migração nas Rolhas

Tomando como exemplo uma rolha natural, marcada com o nº 29,

$$\% \text{ Absorção} = \frac{m_{\text{final}} - m_{\text{inicial}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{B.3})$$

$$\% \text{ Absorção}(\text{Natural}_{29}) = \frac{2,9 - 2,5}{2,5} \times 100 = 16,0\%$$

$$\% \text{ Migração} = \frac{C_{\text{migração}}}{C_{\text{inicial}}} \times 100$$

$$(\text{B.4}) \% \text{ Migração}(\text{Natural}_{29}) = \frac{15}{38,18} \times 100 = 39\%$$

3. Rectas de Calibração

Tabela B.4 – Associação de compostos por grupos químicos, para a quantificação

Grupos	Compostos	Calibração
Ésteres de Etilo	Octanoato de Etilo	Octanoato de Etilo
	Hexanoato de Etilo	
	9-Decanoato de Etilo	Decanoato de Etilo
	Dodecanoato de Etilo	
	Decanoato de Etilo	
	Octanoato de Isoamilo	
Ácidos	Ácido Hexanóico	Ácido Hexanóico
	Ácido Octanóico	
	Ácido Decanóico	
	Ácido Dodecanóico	
Ésteres Acetatos	Acetato de Etilo	Acetato de Etilo
	Acetato de Fenetilo	Acetato de fenetilo
	Acetato de Isoamilo	Acetato de Isoamilo
Álcoois Superiores	1-Propanol	1-Propanol
	Álcool de Isoamilo	Álcool de Isoamilo
	Álcool de Isobutilo	
		Álcool de Fenetilo

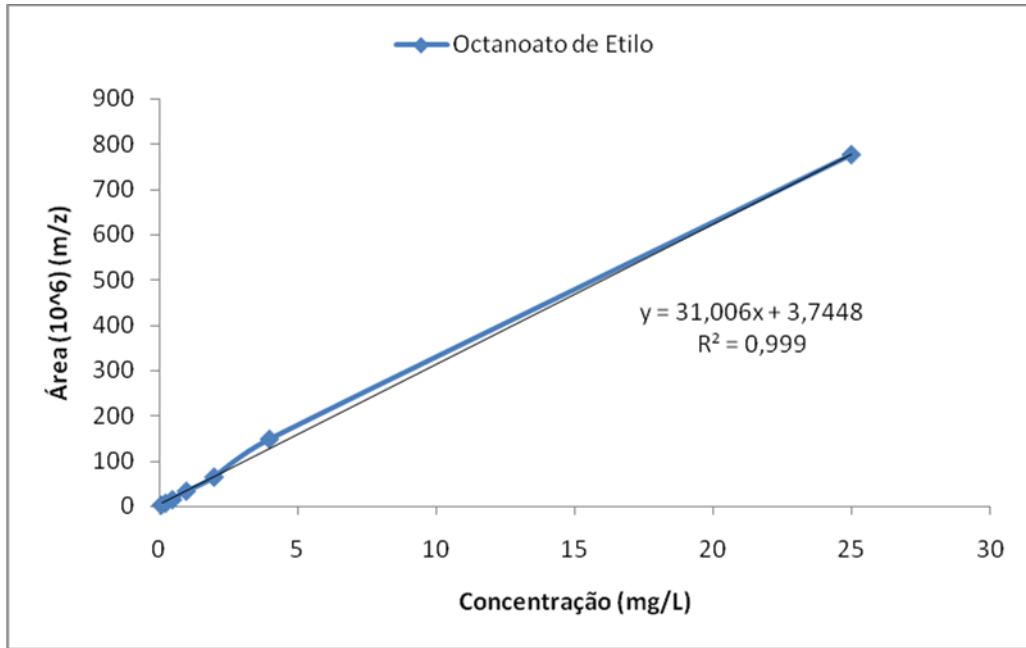


Figura B.6: Recta de calibração do composto Octanoato de Etilo [0-25] mg/L

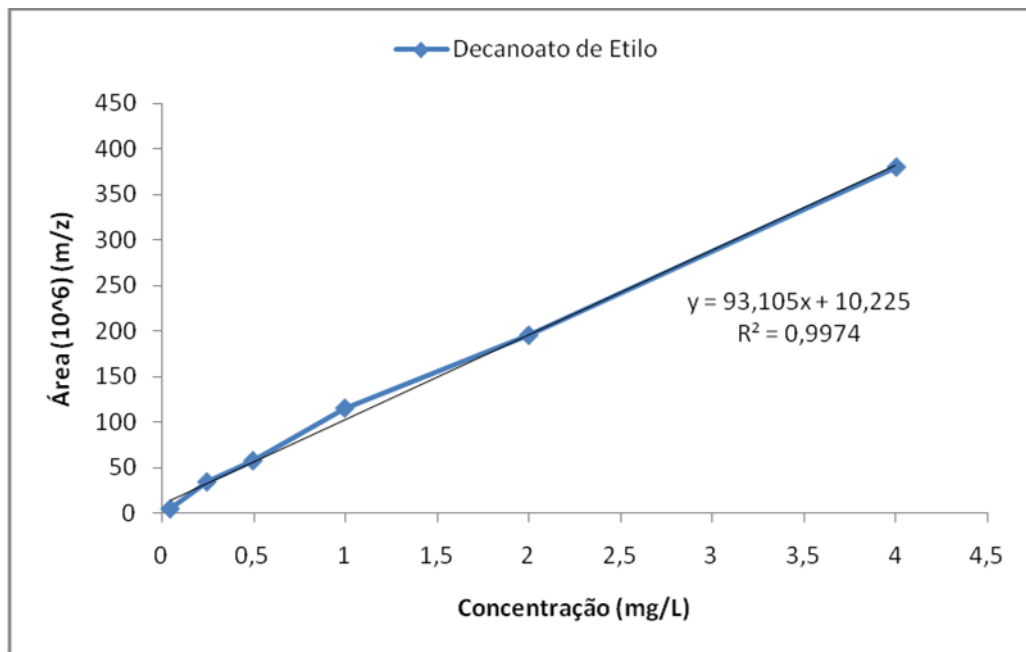


Figura B.7: Recta de calibração do composto Decanoato de Etilo [0-4] mg/L

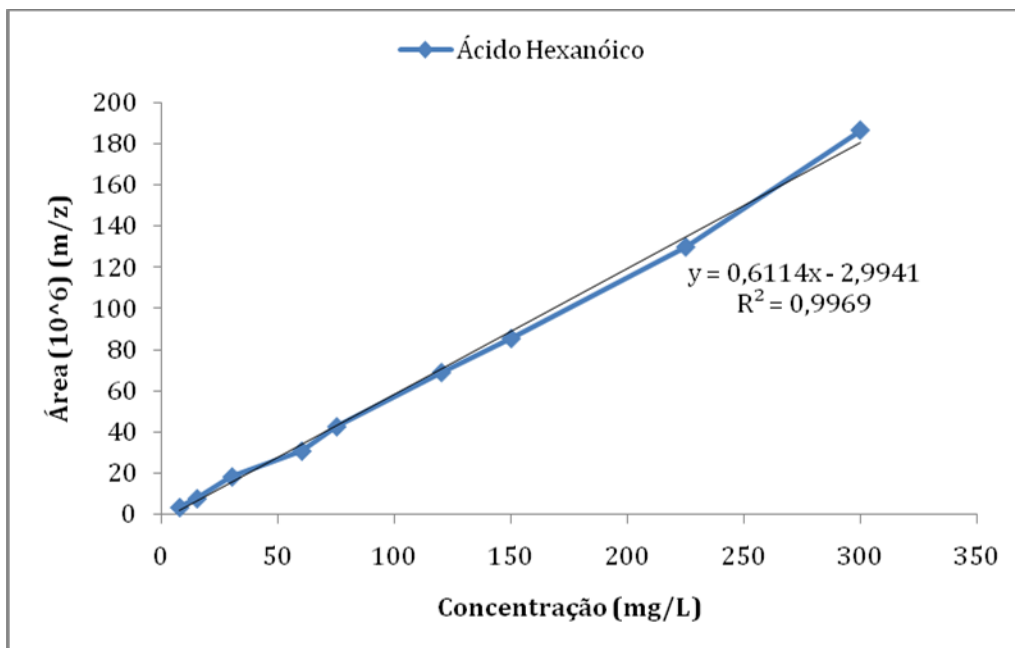


Figura B.8: Recta de calibração do composto Ácido hexanóico [0-300] mg/L

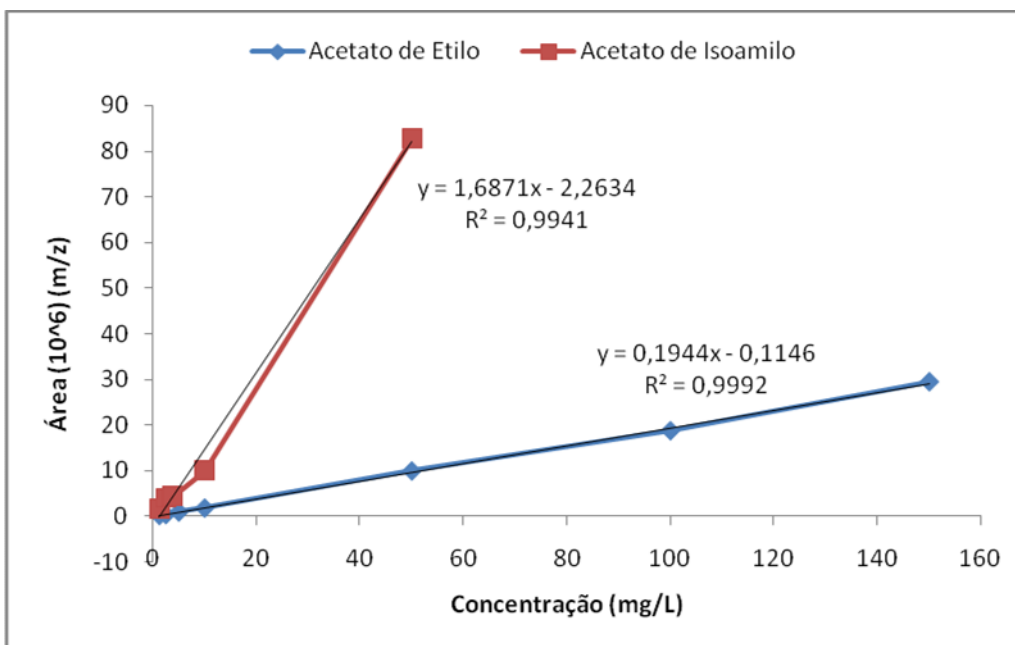


Figura B.9: Recta de calibração dos compostos Acetato de Etilo [0-150] mg/L e Acetato de Isoamilo [0-50] mg/L

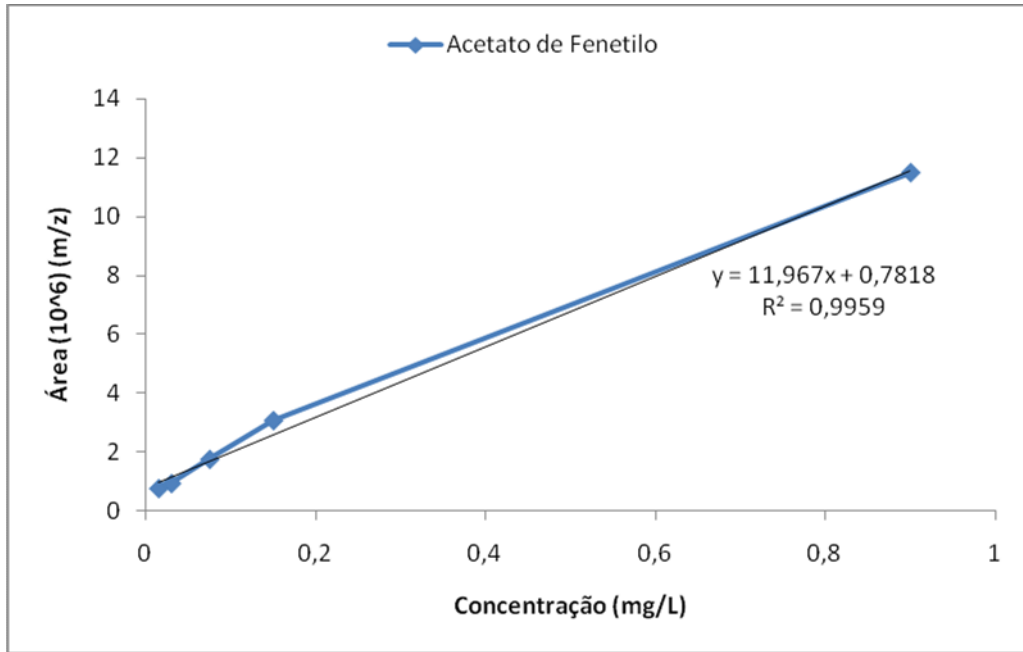


Figura B.10: Recta de calibração do composto Acetato de Fenetilo [0-0,9] mg/L

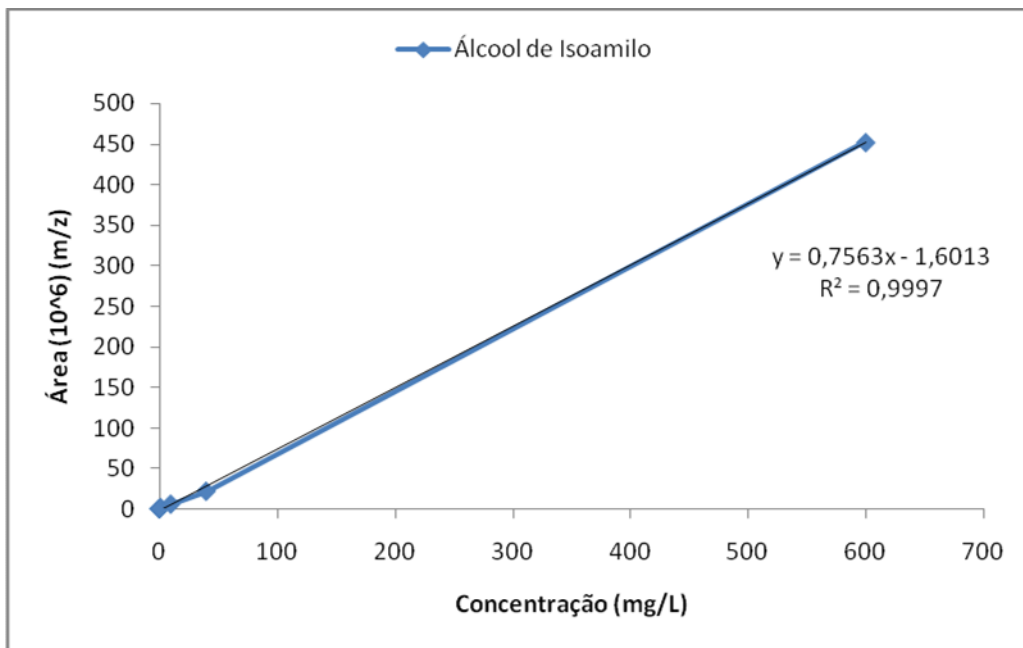


Figura B.11: Recta de calibração do composto Álcool Isoamílico [0-600] mg/L

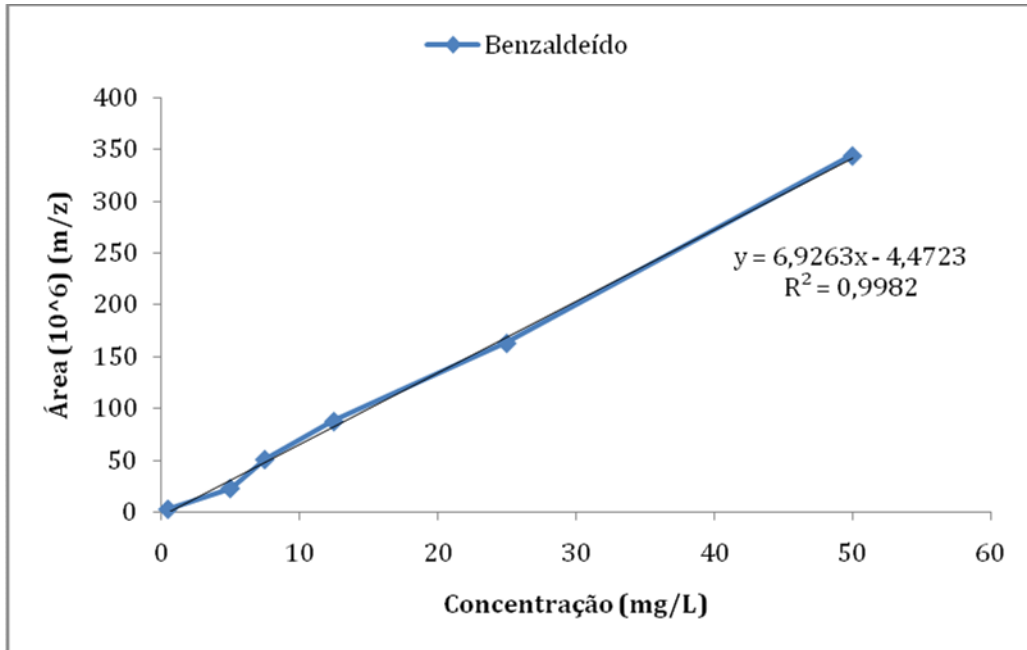


Figura B.12: Recta de calibração do composto Benzaldeído [0-50] mg/L

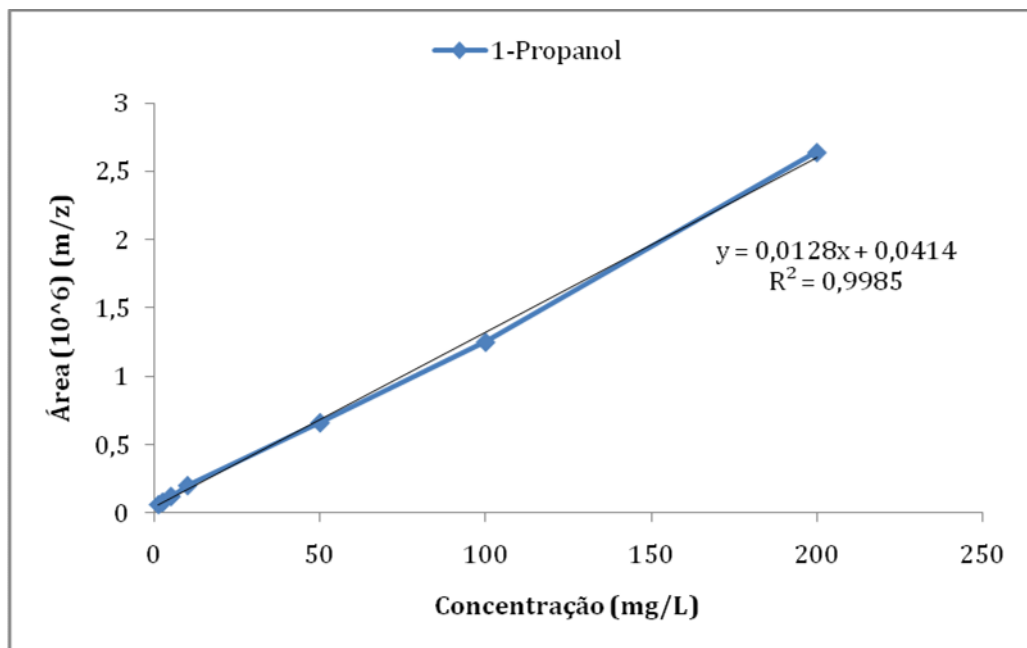


Figura B.13: Recta de calibração do composto 1-Propanol [0-200] mg/L