

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes de vinho

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Dissertação em Ambiente Empresarial

Cátia Alexandra Delindro Alves

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



Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: Professor Doutor Fernão Magalhães

Orientador na empresa: Professor Doutor Miguel Cabral

Março de 2010

Agradecimentos

A realização deste projecto não teria sido possível sem a colaboração de inúmeras pessoas, às quais gostaria de deixar os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Miguel Cabral e ao Professor Doutor Fernão Magalhães pela dedicação e acompanhamento demonstrados no decorrer da tese e ainda pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer de forma muito especial ao Doutor Paulo Lopes e ao Professor Doutor Adélio Mendes por todo o empenho, dedicação e prontidão na resolução dos obstáculos surgidos durante a realização da tese e pela orientação do trabalho.

Um agradecimento sincero às colaboradoras do I&D, Doutora Isabel Roseira, Eliana Reis, Salomé Reis e Patrícia Oliveira pela boa disposição, dedicação e ajuda oferecida em todas as etapas do projecto.

Às minhas colegas Juliana Marques, Beatriz Duarte e Lídia Magalhães pelo companheirismo e compreensão demonstrada ao longo deste trabalho.

Agradeço a toda a equipa da *Amorim Cork Research* por toda a ajuda prestada.

Desejo agradecer à Amorim & Irmãos S.A. pelo financiamento atribuído.

Por fim, aos familiares e amigos mais próximos, pais, irmãos, Franco e Margarida pela compreensão e apoio dado durante todos os momentos que levaram à conclusão de mais uma etapa do meu percurso académico.

Resumo

Dois estudos foram conduzidos de forma a estudar a migração de cloroanisóis e fenóis voláteis através de diferentes vedantes e a posterior contaminação do vinho. Num dos estudos, as garrafas de vinho foram vedadas com vedantes de cortiça, natural e técnica, e um sintético sendo armazenadas sob atmosfera contaminada com d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP. No outro estudo foram vedadas garrafas com vedantes de cortiça, natural e técnica, dois tipos de sintéticos e cápsulas de rosca, com e sem protecção de cápsula de PVC. A atmosfera de contaminação foi artificialmente contaminada com d_5 -TCA, d_3 -TeCA, d_3 -PCA, d_4 -E4F e d_5 -E4G. Num terceiro trabalho, estudou-se a possível contaminação do vinho com TCA através da sua migração pelo interior da rolha de cortiça, a partir da contaminação artificial do interior das rolhas. Todos os resultados obtidos foram analisados por SPME-GC/MS.

Nas condições experimentais utilizadas nestes estudos, ficou demonstrado que as rolhas de cortiça, natural e técnica, são barreiras efectivas à contaminação exógena, por outro lado, os vedantes sintéticos e cápsulas de rosca são permeáveis aos cloroanisóis e fenóis voláteis, o que resulta na contaminação do vinho engarrafado. O revestimento dos vedantes com cápsula de PVC atribui-lhes uma protecção adicional, sem no entanto impedir completamente a migração destes compostos através dos ditos vedantes. Relativamente à migração do TCA através da rolha de cortiça natural, ao fim de 24 meses de armazenamento, conclui-se que este não é susceptível de migrar do seu interior para o vinho engarrafado.

Palavras-chave: cloroanisóis; fenóis voláteis; cortiça; sintéticos; cápsulas de rosca; contaminação.

Abstract

Two studies were conducted to evaluate the migration of chloroanisoles and volatile phenols through different closures and the posterior contamination of wine. In one of the studies, the wine was sealed with cork stoppers, natural and technical and synthetic closures, and then was stored under contaminated atmosphere with d_5 -TCA and $^{13}C_6$ -TCP. In the other study, the wine was sealed with cork stoppers, natural and technical, two types of synthetic closures and screw caps, with or without PVC cap. The contamination atmosphere was artificial contaminated with d_5 -TCA, d_3 -TeCA, d_3 -PCA, d_4 -E4F e d_5 -E4G. Finally, other study was conducted to evaluate the migration of TCA from the interior of the cork stopper to bottled wine. All the samples were analyzed by SPME-GC.

Under the conditions of these studies, it was showed that cork stoppers, natural and technical were effective barriers to the exogenous contamination. Conversely, chloroanisoles and volatile phenols penetrated through synthetic closures and screw caps contaminating bottled wines. The PVC caps conferred some extra protection to all closures; still, chloroanisoles and volatile phenols migrated through them. After 24 months of storage, TCA doesn't migrate from the interior of natural cork stoppers to wine.

Keyword: chloroanisoles; volatile phenols; cork, synthetics, screw caps; contamination.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Haloanisóis	1
1.2	Fenóis Voláteis	3
1.3	Contributos do Trabalho.....	5
1.4	Organização da Tese	5
2	Estado da Arte	7
3	Estudo da migração do d₅-TCA do interior das rolhas de cortiça natural para o vinho. 9	9
3.1	Material e métodos	9
3.1.1	Contaminação do interior das rolhas e engarrafamento	9
3.1.2	Análise do d ₅ -TCA no vinho e nas rolhas.....	10
3.1.3	Análise de dados	11
3.2	Resultados	11
4	Estudo da migração atmosférica de cloroanisóis através de diferentes vedantes para o interior de uma garrafa de vinho	14
4.1	Material e métodos	14
4.1.1	Contaminação atmosférica	14
4.1.2	Análise do d ₅ -TCA e ¹³ C ₆ -TCP na solução hidroalcoólica e nos vedantes	15
4.1.3	Análise de dados	16
4.2	Resultados	16
5	Estudo da migração de fenóis voláteis e cloroanisóis através de diferentes vedantes20	20
5.1	Material e métodos	20
5.1.1	Contaminação atmosférica, engarrafamento e armazenamento	20
5.1.2	Análise dos cloroanisóis e fenóis voláteis no vinho e nos vedantes	21
5.1.3	Análise de dados	22
5.2	Resultados	22
6	Conclusões	30
7	Avaliação do trabalho realizado.....	31
7.1	Objectivos Realizados.....	31

7.2	Outros Trabalhos Realizados.....	31
7.3	Limitações e Trabalho Futuro	31
7.4	Apreciação final	32
8	Anexos	36
8.1	Anexo 1 - Contaminação artificial	36
8.2	Anexo 2 - Migração atmosférica de TCA e TCP	41
8.3	Anexo 3 - Migração atmosférica de cloroanisóis e fenóis voláteis.....	46

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA que exemplifica as possíveis vias de formação dos cloroanisóis.</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 - Mecanismo de formação química dos fenóis voláteis.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3 - Esquema representativo da metodologia usada na contaminação artificial.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4 - Esquema representativo da metodologia utilizada na quantificação do d₅-TCA.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5 - Quantidade de d₅-TCA presente no interior das garrafas, na superfície, no vinho, nos discos e no interior das rolhas de controlo para os diferentes tempos de armazenamento.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6 - Esquema da metodologia da contaminação atmosférica</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7 - Esquema da análise e quantificação do d₅-TCA e ¹³C₆-TCP nas rolhas e solução hidroalcoólica</i>	<i>16</i>
<i>Figura 8 - Quantidade de d₅-TCA presente nos vinhos engarrafados com diferentes tipos de vedantes.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 9 - Quantidade de d₅-TCA presente nos diferentes tipos de vedantes: a) parte superior; b) parte central; c) parte inferior.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 10 - Esquema representativo da metodologia usada na quantificação dos cloroanisóis e dos fenóis voláteis.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 11 - Quantidade de d₅-TCA presente no vinho.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 12 - Quantidade de d₅-TCA presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 13 - Quantidade de d₄-E4F presente no vinho.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 14 - Quantidade de d₄-E4F presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 15 - Quantidade de d₅-E4G presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 16 - Curva de calibração do d₅-TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 17 - Curva de calibração para o d₅-TCA em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 18 - Curva de calibração para o d₅-TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 19 - Curva de calibração do d₅-TCA e ¹³C₆-TCP em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.</i>	<i>43</i>

<i>Figura 20 - Curva de calibração do d₅-TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 10000 ng.L⁻¹.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 21 - Curva de calibração do d₅-TCA em solução de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 10000 ng.L⁻¹.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 22 - Curva de calibração para o d₅-TCA, d₃-TeCA e d₃-PCA em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 23 - Curva de calibração do d₅-TCA, d₃-TeCA e d₃-PCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 24 - Curva de calibração do d₅-TCA, d₃-TeCA e d₃-PCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 25 - Curva de calibração do d₄-E4F em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 500 ng.L⁻¹.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 26 - Curva de calibração do d₄-E4G em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 27 - Curva de calibração do d₄-E4F em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 500 ng.L⁻¹.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 28 - Curva de calibração do d₄-E4G em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.</i>	<i>52</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Limites de percepção sensorial e estrutura química dos principais haloanisóis responsáveis pela contaminação dos vinhos.....</i>	<i>2</i>
<i>Tabela 2 - Estrutura química e limites de percepção dos principais fenóis voláteis responsáveis pela contaminação do vinho.</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 3 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa.</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 4 - Programa de temperaturas.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 5 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa.</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 6 - Programa de temperaturas.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 7 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 8 - Parâmetros para análise dos diferentes fenóis voláteis por cromatografia gasosa.</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 9 - Programa de temperaturas.....</i>	<i>48</i>

<i>Tabela 10 - Programa de temperaturas.</i>	<i>49</i>
---	-----------

Notação e Glossário

A_{cont}	Área do pico cromatográfico do contaminante	
$A_{p.i.}$	Área do pico cromatográfico do padrão interno	
$A_{média\ p.i.}$	Média das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno	
A_{cont}^*	Área corrigida dos picos cromatográficos do contaminante	
C_{cont}	Concentração do contaminante	$ng \cdot L^{-1}$

Lista de Siglas

d_4 -E4F	Deutério 4-Etilfenol
d_{10} -E4F	Deutério 4-Etilfenol
d_5 -E4G	Deutério 4-Etilguaicol
d_3 -PCA	Deutério Pentacloroanisol
d_5 -TBA	Deutério 2,4,6-Tribromoanisol
d_5 -TCA	Deutério 2,4,6-Tricloroanisol
$^{13}C_6$ -TCP	Deutério 2,4,6-Triclorofenol
d_3 -TeCA	Deutério 2,3,4,6-Tetracloroanisol
E4C	4-Etilcatecol
E4F	4- Etilfenol
E4G	4- Etilguaiacol
FEUP	Faculdade Engenharia Universidade do Porto
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
I&D	Investigação e Desenvolvimento
MIEQ	Mestrado Integrado em Engenharia Química
PCA	Pentacloroanisol
PVC	Policloreto de vinil
SPME	Microextracção em fase sólida
SPME/GC-MS	Microextracção em fase sólida conjugada com cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
GC-SPME/MS-	Microextracção em fase sólida conjugada com cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
MS	espectroscopia de massa
TBA	2,4,6-Tribromoanisol
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol

TeCA 2,3,4,6-Tetracloroanisol

1 Introdução

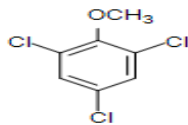
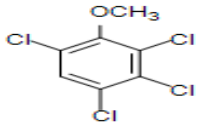
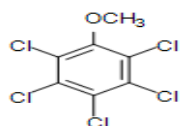
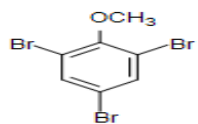
A produção de rolhas ocupa um lugar relevante na indústria transformadora Portuguesa e na economia nacional uma vez que Portugal é o maior produtor mundial de cortiça (Pereira *et al.*, 1999). A contaminação da cortiça é um dos problemas mais relevantes quer para a indústria vitivinícola quer para a indústria corticeira, causando perdas económicas e danificando a reputação das mesmas (Simpson *et al.*, 2005). Os produtos alternativos, como cápsulas de rosca e rolhas sintéticas, têm contribuído para a diminuição da quota de mercado das rolhas de cortiça (Pereira *et al.*, 1999). O designado “gosto a rolha”, ou contaminação do vinho pela rolha de cortiça, tem vindo a ser associado ao 2,4,6-tricloroanisol (TCA), contudo sabe-se agora que são muitos os compostos responsáveis por este fenómeno assim como são diversas as fontes de contaminação a que o vinho está sujeito. Entre os principais compostos que provocam desvios sensoriais ao vinho encontram-se os haloanisóis e os fenóis voláteis. Apesar de se usar o termo “gosto a rolha” quando um vinho apresenta um aroma que não é o habitual este termo não é o mais correcto, o apropriado deveria ser aroma a mofo ou fúngico.

1.1 Haloanisóis

Os haloanisóis são uns dos principais contaminantes do vinho, sendo capazes de destruir o seu aroma e gosto original, conferindo-lhe um aroma a mofo e bafio. Como principais características destes compostos temos a sua grande volatilidade, sendo facilmente transmitidos através do ar, e possuírem um limiar de percepção olfactivo muito baixo em solução alcoólica e vinho (tabela 1) (Coque *et al.*, 2006).

Podemos dividir os haloanisóis em dois grupos - cloroanisóis e bromoanisóis, onde se destacam como principais responsáveis pelo chamado aroma fúngico o tricloroanisol (2,4,6-TCA), o tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o tribromoanisol (2,4,6-TBA).

Tabela 1 - Limites de percepção sensorial e estrutura química dos principais haloanisóis responsáveis pela contaminação dos vinhos.

Composto	Estrutura	Limite de percepção sensorial (Coque <i>et al.</i> , 2006)
2,4,6-TCA		Água: 30-300 pg·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 2-6 ng·L ⁻¹
2,3,4,6-TeCA		Água: 4 ng·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 10-15 ng·L ⁻¹ (branco e tinto)
PCA		Limite de detecção: >10 µg·L ⁻¹
2,4,6-TBA		Água: 8-30 pg·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 3-6 ng·L ⁻¹

Muitas hipóteses foram propostas para explicar a origem dos cloroanisóis mas o único mecanismo cientificamente provado é a biometilação de clorofenóis. Esta reacção é conduzida por uma enzima denominada por clorofenol O-metiltransferase (CPOMT), que pode metilar uma série de clorofenóis (Coque *et al.*, 2006). Trata-se de uma reacção bioquímica de defesa levada a cabo por fungos filamentosos, uma vez que transforma os clorofenóis, altamente tóxicos, em cloroanisóis que são inofensivos a e estes microrganismos (Alvarez-Rodrigues *et al.*, 2003)

Os clorofenóis, precursores dos cloroanisóis, podem ser formados a partir de uma reacção directa entre os produtos resultantes da degradação de açúcares e da lenhina com fontes de cloro presentes no meio ambiente, e/ou a partir de compostos organo-clorados, que fazem parte da composição química de diferentes produtos (pesticidas, desinfectantes, etc.) (Coque *et al.*, 2006). A figura 1 representa algumas das possíveis vias de formação dos cloroanisóis.

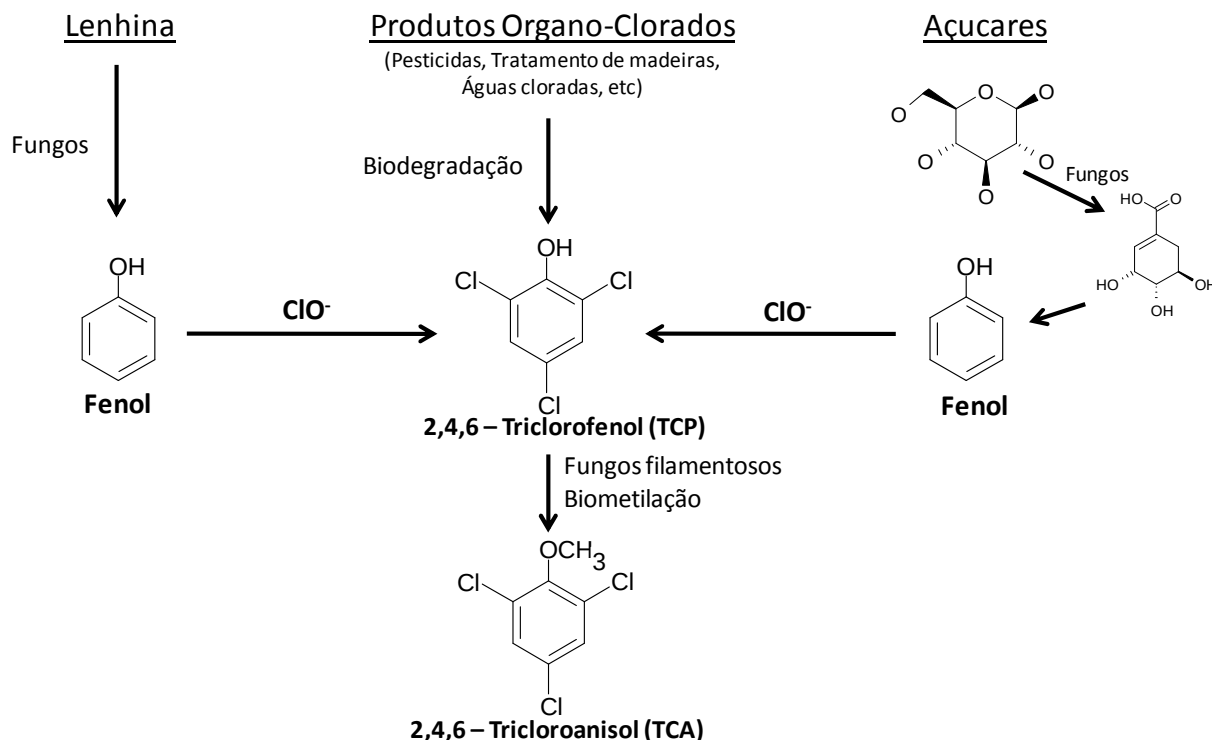


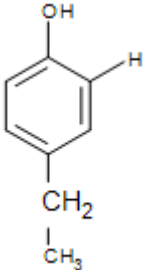
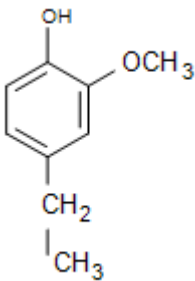
Figura 1 - Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA que exemplifica as possíveis vias de formação dos cloroanisóis.

1.2 Fenóis Voláteis

A contaminação por fenóis voláteis é outro problema da indústria vitivinícola, pois estes conferem ao vinho um aroma normalmente designado por “suor a cavalo” (Loureiro *et al.*, 2003). Todos os vinhos podem apresentar este defeito, contudo vinhos envelhecidos em barricas de carvalho são mais susceptíveis a este tipo de contaminação. (Loureiro *et al.*, 2006). Esta contaminação está associada à presença de bactérias do género *Brettanomyces* nos vinhos, principalmente aqueles que estiveram em contacto com recipientes em condições sanitárias precárias.

Os principais fenóis voláteis dos vinhos são o 4-etilfenol (E4F), o 4-etilguaicol (E4G) e o 4-etilcatecol (E4C), sendo a sua estrutura química caracterizada por um anel fenólico e um radical com diferentes composições (tabela 2) (Loureiro *et al.*, 2003).

Tabela 2 - Estrutura química e limites de percepção dos principais fenóis voláteis responsáveis pela contaminação do vinho.

Composto	Estrutura	Limite de percepção sensorial no vinho / μgL^{-1}	Descritor aromático
4 -Etilfenol (4-EF)		430	Couro Cavalo
4-Etilguaicol (4-EG)		33	Apimentado Cravinho Fenólico

Os fenóis voláteis são produtos secundários produzidos por leveduras, fungos e bactérias que podem afectar negativamente o sabor quer do vinho quer de alguns alimentos (Loureiro *et al.*, 2006).

A produção destes compostos resulta da acção sequencial de duas enzimas. A enzima cinamato descarboxilase que transforma os ácidos cinâmicos em vinilfenóis, que por sua vez são reduzidos pela acção de uma vinil-fenol redutase, em etilfenóis (figura 2). Estas actividades enzimáticas são da responsabilidade da acção das bactérias do género *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet, 1995).

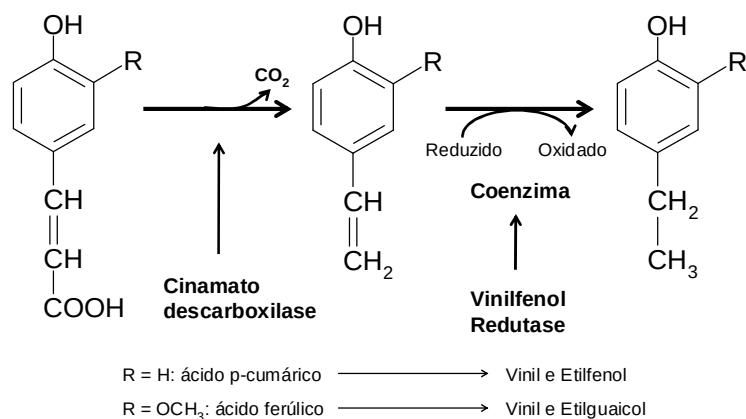


Figura 2 - Mecanismo de formação química dos fenóis voláteis.

1.3 Contributos do Trabalho

A Amorim & Irmãos S.A. consciente da importância da problemática da contaminação do vinho criou, em 2000, o departamento de I&D de modo a melhorar o desempenho sensorial e técnico das rolhas de cortiça. Com este projecto pretende-se por um lado clarificar o mecanismo de contaminação do vinho a partir da rolha de cortiça e por outro verificar a influência das propriedades barreira ao oxigénio de diferentes vedantes na contaminação exógena de garrafas de vinho. Para o efeito estudou-se a migração de cloroanisóis e fenóis voláteis através de diferentes vedantes e ainda o efeito protector da cápsula de PVC sobre o gargalo das garrafas.

1.4 Organização da Tese

A presente tese encontra-se dividida em sete capítulos.

No capítulo 1, a Introdução, pretende enquadrar o leitor para alguns conceitos essenciais relativos à contaminação do vinho e toda a problemática actual e é apresentado os pressupostos em que se baseia a presente investigação.

O capítulo 2 descreve o Estado da Arte, sendo feita uma revisão bibliográfica relacionada com o problema da contaminação do vinho. Os dados presentes nesta secção servem de apoio ao projecto realizado.

No capítulo 3 descreve-se a metodologia e os resultados obtidos no estudo da migração atmosférica para o interior de uma garrafa de vinho, no ponto de análise correspondente aos 24 meses de conservação.

O capítulo 4 descreve a metodologia e os resultados referentes aos 24 meses do estudo da migração de d₅-TCA do interior da rolha de cortiça natural para o vinho.

No capítulo 5 é descrito a metodologia usada no estudo da migração de cloroanisóis e fenóis voláteis através de diferentes vedantes, assim como os resultados obtidos no ponto de análise de 12 meses.

Por último, no capítulo 6 são referidas as principais conclusões dos estudos efectuados.

2 Estado da Arte

Os compostos que provocam desvios sensoriais no vinho têm sido largamente estudados, assim como os factores que afectam a sua transmissão da cortiça para o vinho. Os principais factores incluem a solubilidade desses compostos contaminantes no vinho, bem como a sua afinidade para a superfície e as partes interiores da cortiça; a sua localização na superfície e no interior do vedante; a taxa de velocidade a que o contaminante pode migrar pela matriz da cortiça; o volume de vinho que está em contacto com o vedante; e se a sua transmissão se dá em vinho engarrafado ou em cortiças maceradas (Sefton *et al.*, 2005).

O TCA é reconhecido como a principal causa de contaminação do vinho engarrafado, mas por vezes a sua concentração no vinho pode não corresponder à intensidade de contaminação. Presentemente, há aproximadamente 12 compostos, além do TCA, que estão associados à contaminação dos vinhos (Sefton *et al.*, 2005).

Pollnitz *et al.* (1996) levou a cabo uma análise sensorial a vinhos para tentar explicar a relação que existia entre a cortiça contaminada com cloroanisóis e a consequente contaminação do vinho. Do exame sensorial, 18 de 374 garrafas foram identificadas com a presença de “*off-flavors*” pelos participantes. Quando se procedeu à quantificação do tricloroanisol nos vinhos contaminados o seu valor estava abaixo, ou muito perto do limite de detecção sensorial, o que indica a presença de outros compostos responsáveis pelos odores desagradáveis.

Howland *et al.* (1997) mostraram que o TCA se encontra preferencialmente na costa da cortiça e não tanto na parte interior, não sendo encontradas diferenças significativas entre os anéis de crescimento nem entre a parte central e os extremos da cortiça. Outros autores mostraram que a localização de cloroanisóis é variável de cortiça para cortiça, havendo ainda variação dos mesmos na mesma prancha e até mesmo na mesma rolha.

As inconsistências entre a quantidade de TCA presente nas rolhas e nos respectivos vinhos sugerem que a distribuição deste na cortiça não é uniforme e que a sua migração pela cortiça é lenta. A percentagem de TCA que é susceptível de migrar para o vinho varia de 0,6-25%, como resultado de uma menor superfície de contacto. Este estudo conclui que a presença de TCA na superfície da cortiça em contacto com o vinho, a temperatura e o tempo de engarrafamento têm uma influência na migração do tricloroanisol para o vinho (Juanola *et al.*, 2004). Várias investigações que analisaram a localização do TCA nos vedantes confirmaram que a sua concentração não é uniforme ao longo da cortiça, havendo uma maior contaminação dos vinhos quando este se localiza na superfície da cortiça (Sefton *et al.*,

2005). Apesar de estes estudos indicarem que apenas ocorre transferência de cloroanisóis da cortiça para o vinho quando este está em contacto directo com a parte da rolha de cortiça contaminada, não existem evidências claras se o TCA presente no interior da cortiça pode migrar para o vinho. Embora Simpson e Sefton (2007) sugiram que o TCA presente no interior das rolhas não afecta a contaminação dos vinhos.

A cortiça pode ser contaminada com tricloroanisol por migração atmosférica. Barker *et al.* (2001) mostrou que as rolhas de cortiça natural quando expostas a uma atmosfera saturada com d5-TCA, absorvem quantidades importantes deste composto, mesmo na ausência de contacto com a fonte original de contaminação.

Capone *et al.* (2002) avaliou a migração de TCA através de rolhas de cortiça natural. Os resultados obtidos por esta equipa mostram que a contaminação de d5-TCA está restrita à parte superior das rolhas. Desta forma ficou provado que os vedantes de cortiça são excelentes barreiras à transmissão do TCA a partir de fontes externas. Contudo, este estudo incidiu apenas sobre as rolhas de cortiça natural; nenhum outro estudo de migração foi realizado para outros vedantes.

Simpson e Sefton (2007) sugerem que muito do TCA presente nas rolhas de cortiça contaminadas pode já estar presente nas pranchas de cortiça antes da sua extracção; contudo, após esta operação e até à produção final de rolhas a contaminação pode ocorrer. A forte presença de TCA nas pranchas de cortiça sugere que o seu precursor (triclorofenol) está presente na floresta em altas quantidades, devendo-se essa presença ao uso de insecticidas e/ou pesticidas. Uma outra conclusão é que mesmo que o vedante esteja muito contaminado, se essa contaminação estiver na matriz da rolha não haverá contaminação do vinho.

Assim como os haloanisóis existem outros compostos que estão a ser alvo de estudo porque também são considerados contaminantes dos vinhos e nomeadamente da atmosfera das caves, são eles os fenóis voláteis.

O presente projecto pretende complementar a bibliografia existente, aprofundando o estudo sobre a migração de cloroanisóis através de diferentes vedantes, bem como a sua extensão aos fenóis voláteis. Pretende-se também averiguar os efeitos do revestimento com cápsulas de PVC na migração destes compostos. A migração de tricloroanisol através do interior da rolha de cortiça natural foi também estudada.

3 Estudo da migração do d₅-TCA do interior das rolhas de cortiça natural para o vinho

Neste capítulo descreve-se o protocolo experimental seguido para o estudo da migração do d₅-TCA do interior de rolhas de cortiça natural para o vinho engarrafado.

3.1 Material e métodos

O método de contaminação artificial de uma rolha de cortiça natural usado foi implementado e otimizado por Lopes (2008).

O estudo foi planeado para 48 meses, sendo feitas análises ao fim de 9 e 30 dias, 4, 8, 12, 18, 24 e 36 meses de armazenamento de forma a quantificar o d₅-TCA no vinho e nas rolhas de cortiça natural. Uma vez que este foi um projecto iniciado por anteriores estagiários, neste estágio apenas foi realizada a análise correspondente ao ponto de 24 meses. Para não ser repetitivo passa-se a descrever o procedimento de contaminação e análise sucintamente.

3.1.1 Contaminação do interior das rolhas e engarrafamento

Preparou-se uma solução contaminante de d₅-TCA com uma concentração de 100 mg.L⁻¹. O deutério-2,4,6-TCA foi usado de forma a podermos distinguir a contaminação artificial de uma eventual contaminação com 2,4,6 -TCA. Injectaram-se 10 µl no interior de cada uma das 200 rolhas de cortiça natural (Figura 3). Para impedir as perdas de solução, o orifício de injeção foi coberto com cola Araldite Ceys ® e deixou-se secar e estabilizar todas as rolhas durante 48 horas à temperatura ambiente.

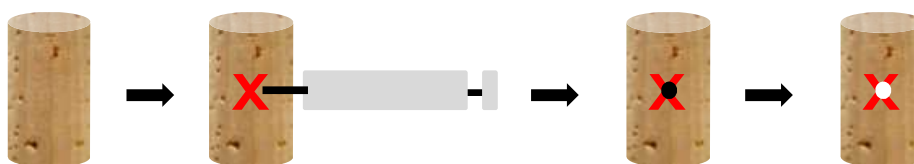


Figura 3 - Esquema representativo da metodologia usada na contaminação artificial.

Das 200 rolhas contaminadas, escolheu-se aleatoriamente 72, as que restaram foram utilizadas como controlo do nível de contaminação em cada ponto de análise. As 72 rolhas escolhidas foram utilizadas para vedar garrafas, do tipo bordalesa, com 375 mL de vinho branco, Marquês de Cáceres (2007). As condições de engarrafamento e as características do vinho utilizado encontram-se descritas em Lopes (2008).

3.1.2 Análise do d₅-TCA no vinho e nas rolhas

Em cada período de armazenamento analisaram-se 9 garrafas segundo o protocolo optimizado por Lopes (2008). O procedimento utilizado está representado na Figura 4.

Realizou-se um pequeno corte superficial no vidro do gargalo de forma a podermos separar o mesmo do resto da garrafa, esta operação é feita através de um batimento do gargalo contra uma superfície dura (pedra). De forma a evitar contaminações cruzadas os gargalos foram imediatamente enrolados em papel de alumínio.

Para se proceder à quantificação do d₅-TCA por GC-SPME/MS-MS pipetou-se 5 mL de vinho de cada garrafa. A preparação da amostra encontra-se descrita no anexo 1.

Os vedantes foram retirados dos gargalos após estes terem sido partidos com um martelo. Em seguida, cortou-se um pequeno disco (aproximadamente 5 mm) da parte inferior da rolha que esteve em contacto com o vinho. Quer o disco quer a rolha foram colocados a macerar individualmente em solução hidroalcoólica 12% (v/v) durante 24 horas, sendo depois efectuada a quantificação de d₅-TCA superficial nos diferentes macerados por SPME/GC-MS-MS utilizando o procedimento descrito no anexo 1.

Para analisar a quantidade de d₅-TCA no interior das rolhas procedeu-se ao corte destas em quatro partes sensivelmente iguais com o auxílio de uma faca; as secções resultantes foram maceradas individualmente durante 24 horas à temperatura e humidade ambiente. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para analisar as 9 rolhas de “controlo”. Tal como descrito anteriormente, a quantificação de d₅-TCA foi realizada por GC-SPME/MS-MS.

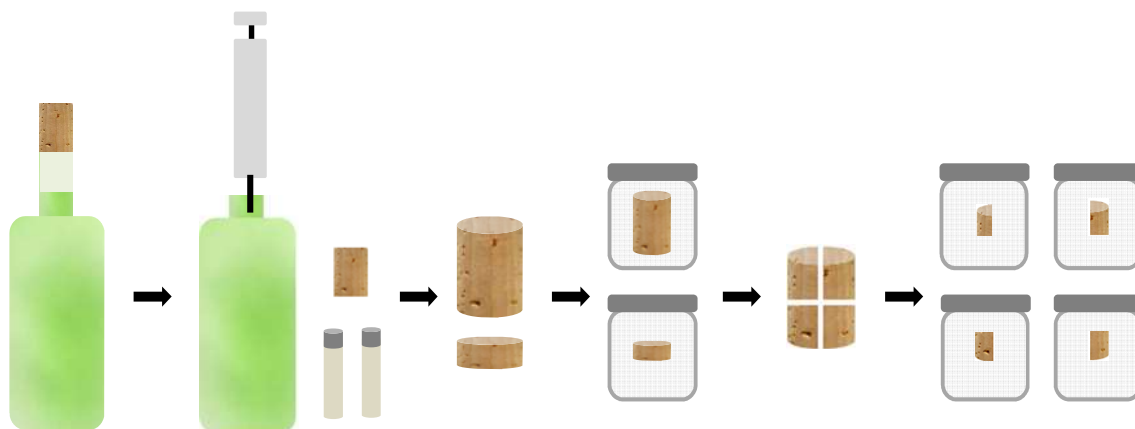


Figura 4 - Esquema representativo da metodologia utilizada na quantificação do d_5 -TCA

3.1.3 Análise de dados

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado com uma aplicação informática implementada no *Microsoft Office Excel*, o *XLSTAT - Statistical Software*.

3.2 Resultados

Ao fim de 24 meses de armazenamento verificou-se que o vinho apresentava traços de d_5 -TCA, mantendo-se num valor próximo de 0,5 ng, com a excepção do ponto relativo aos 4 meses em que apresenta um valor de 0,14 ng. (Figura 5). Todos os valores obtidos são estatisticamente semelhantes, só tendo sido encontrada uma diferença significativa no ponto relativo aos 4 meses.

Através da análise da Figura 5, verificamos que também os discos se encontravam ligeiramente contaminados, tendo sido detectada a presença de d_5 -TCA em quantidades inferiores a 0,15 ng, tratando-se portanto de uma contaminação residual.

Relativamente à superfície das rolhas, verificou-se que ao fim de 24 meses de armazenamento, estas estavam contaminadas com 0,7 ng de d_5 -TCA. É possível estabelecer que a contaminação superficial ao longo do tempo se mantém sensivelmente constante, o que mostra que estes resultados resultam do processo de contaminação inicial, estando provavelmente localizada junto ao local onde se realizou a injeção de d_5 -TCA. No entanto, quantidades residuais de d_5 -TCA estão em toda a superfície das rolhas resultado da maceração individual que cada rolha foi submetida para se determinar o d_5 -TCA inicial. Este factor

deverá ser responsável pela contaminação residual que foi encontrada nos discos e nos vinhos.

No interior das rolhas de cortiça natural, verificou-se que estas se encontravam altamente contaminadas, em média 9 ng de d₅-TCA. A contaminação do interior das rolhas parece ter estabilizado ao fim de 4 meses, pois os valores obtidos após este período não são estatisticamente diferentes ($p = 0,05$).

Relativamente ao interior das rolhas de controlo, ao fim de 24 meses de conservação foi possível quantificar cerca de 17 ng de d₅-TCA, ou seja, estas rolhas também se encontravam altamente contaminadas. Apesar de haver um aumento na quantidade encontrada em relação ao ponto de 8 meses e 18 meses, todos os resultados são estatisticamente semelhantes havendo apenas uma diferença significativa entre os 8 e os 18 meses.

O facto de se verificar alguma variação na quantidade de d₅-TCA nas rolhas reflecte a dificuldade e heterogeneidade de contaminação do interior da rolha. Apesar de se usar a mesma metodologia em todas as rolhas nunca se consegue contaminar com a mesma quantidade. Contudo a variação encontrada na quantidade de d₅-TCA pode também dever-se ao facto de equipamentos e operadores diferentes terem sido utilizados para a quantificação deste composto ao longo dos diferentes pontos de análise.

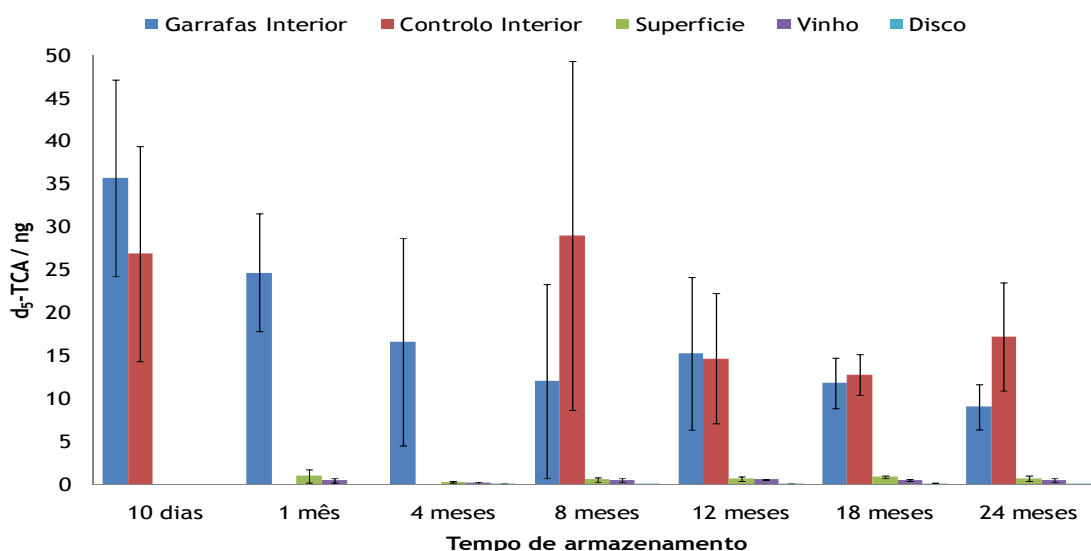


Figura 5 - Quantidade de d₅-TCA presente no interior das garrafas, na superfície, no vinho, nos discos e no interior das rolhas de controlo para os diferentes tempos de armazenamento.

Podemos então concluir que o d₅-TCA não migra do interior da cortiça para o vinho, o que está de acordo com a hipótese sugerida por Pollnitz et al. (1996) em que a contaminação do

vinho pela cortiça apenas ocorre se o vinho estiver em contacto com a zona da rolha contaminada.

4 Estudo da migração atmosférica de cloroanisóis através de diferentes vedantes para o interior de uma garrafa de vinho

Neste capítulo descreve-se o protocolo experimental desenvolvido por Lopes (2008) para verificar se existe migração do d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP através de diferentes tipos de vedantes para uma solução hidroalcoólica engarrafada. Este trabalho pretende dar continuação a um trabalho anteriormente iniciado pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos S.A.

4.1 Material e métodos

Um estudo de engarrafamento foi planeado para 48 meses. Garrafas brancas do tipo bordalesa (375 mL) contendo a solução hidroalcoólica (12% de etanol) foram vedadas com 3 tipos de vedantes: rolhas naturais de cortiça de qualidade superior (38mm x 24mm), rolhas técnicas de cortiça Neutrocork (38mm x 24mm) e vedantes sintéticos Nomatic Classic (37mm x 24mm). As propriedades físicas dos vedantes que foram utilizados neste estudo encontram-se descritas em Lopes (2008). Realizaram-se análises de d_5 -TCA e o $^{13}C_6$ -TCP ao fim de 3, 6, 12, 24 e 48 meses de armazenamento, quer à solução hidroalcoólica quer aos vedantes. Na medida em que este foi um projecto iniciado em 2008 por anteriores estagiários, neste estágio apenas se procedeu à sua continuação, sendo feita a análise correspondente ao ponto de 24 meses.

4.1.1 Contaminação atmosférica

A metodologia seguida foi desenvolvida e optimizada por Lopes (2008), que se baseou num artigo de Barker *et al.* (2001).

Encheram-se 90 garrafas do tipo bordalesa com 370 mL de solução hidroalcoólica 12% (v/v), sendo estas posteriormente vedadas com os diferentes tipos de vedantes (30 garrafas por cada tipo de vedante). As condições de engarrafamento encontram-se descritas em Lopes (2008).

Cada uma das garrafas foi colocada em frascos de vidro de 2 L (atmosfera de conservação) e adicionaram-se 30 μL de cada solução contaminante, aplicando a gota na parede do frasco (Figura 6). A quantidade total teórica de $\text{d}_5\text{-TCA}$ e de $^{13}\text{C}_6\text{-TCP}$ foi respectivamente 15,7 e 18,7 μg .

Todos os frascos foram cobertos com papel de alumínio e parafilme de forma a minimizar as perdas para o exterior, sendo de seguida devidamente fechados. Estes frascos foram armazenados num local sob condições de temperatura e humidade ambiente (i.e. não controlado).

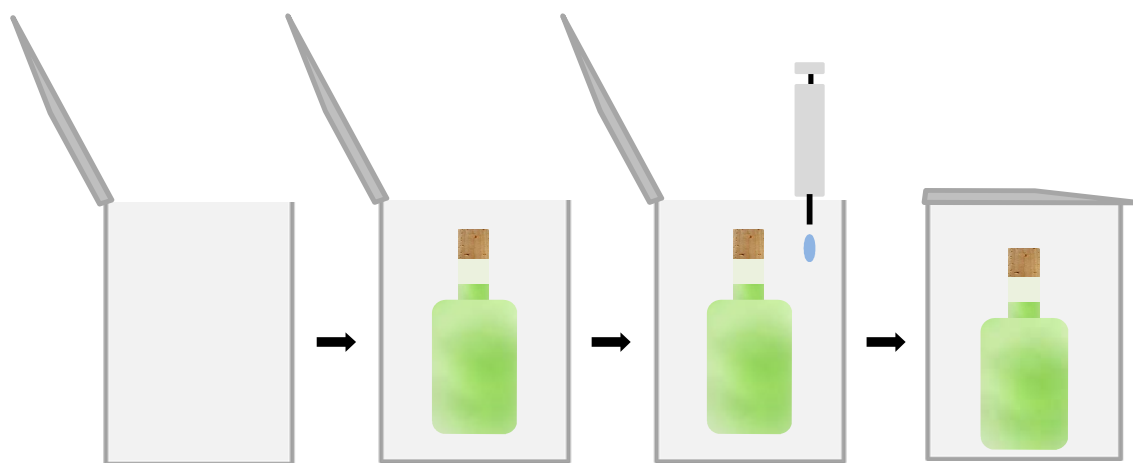


Figura 6 - Esquema da metodologia da contaminação atmosférica

4.1.2 Análise do $\text{d}_5\text{-TCA}$ e $^{13}\text{C}_6\text{-TCP}$ na solução hidroalcoólica e nos vedantes

Em cada etapa de análise foram analisadas um total de 15 garrafas, uma vez que se efectuou uma medição a 5 garrafas por cada tipo de vedante. De modo a prevenir uma contaminação do laboratório, os frascos foram abertos e deixados ao ar entre 24 a 48 horas.

Realizou-se um pequeno corte superficial no vidro do gargalo de forma a podermos isolar o mesmo do resto da garrafa, este isolamento é feito através do batimento forte do gargalo contra uma superfície dura (pedra). De forma a evitar contaminações cruzadas os gargalos foram imediatamente enrolados em papel de alumínio.

Para se proceder à quantificação do $\text{d}_5\text{-TCA}$ e $^{13}\text{C}_6\text{-TCP}$ por SPME/GC-MS pipetou-se 5 mL da solução hidroalcoólica de cada garrafa. A preparação da amostra encontra-se descrita no anexo 2.

Os vedantes foram retirados dos gargalos após estes terem sido partidos com um martelo. De seguida, seccionou-se as rolhas em três partes iguais para podermos analisar a parte superior,

central e inferior separadamente. Macerou-se individualmente cada uma destas partes, em frascos de 60 mL, com solução de carbonato de potássio durante 24 horas (Figura 7). As quantidades de d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP foram determinadas por SPME/GC-MS quer para as soluções hidroalcoólicas quer para as soluções de maceração (anexo 2).

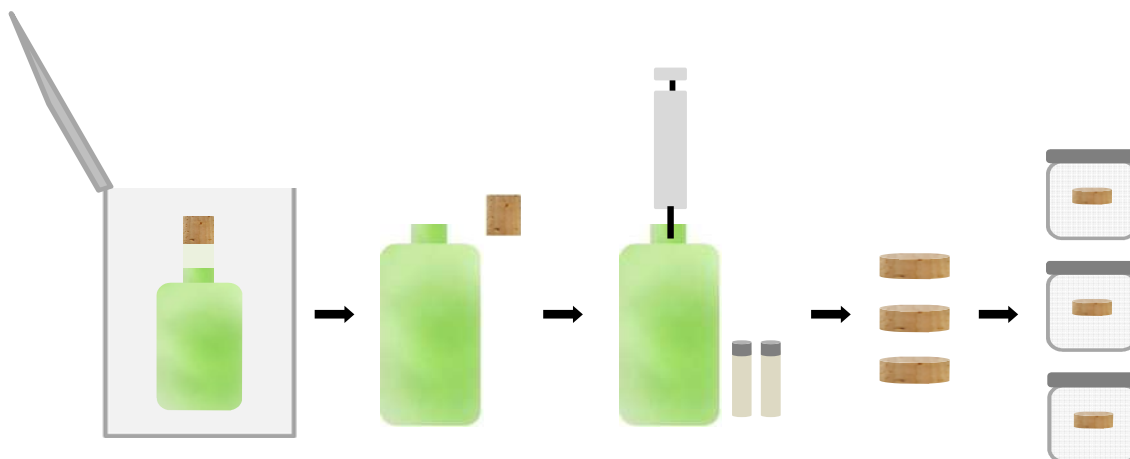


Figura 7 - Esquema da análise e quantificação do d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP nas rolhas e solução hidroalcoólica

4.1.3 Análise de dados

O tratamento estatístico dos resultados foi feito recorrendo a uma aplicação informática implementada no *Microsoft Office Excel*, o *XLSTAT - Statistical Software*.

4.2 Resultados

Ao fim de 24 meses de conservação, verificou-se que as soluções hidroalcoólicas que foram vedadas com rolhas de cortiça natural e técnica (Neutrocork) não apresentavam qualquer quantidade de d_5 -TCA. Estes resultados estão de acordo com aqueles que já tinham sido obtidos a 3, 6, 12 meses. Relativamente aos vedantes sintéticos (Nomacorc), a solução hidroalcoólica apresentava uma contaminação média de 1612 ng de d_5 -TCA; isto é, observou-se um aumento de 230% na quantidade de d_5 -TCA em relação ao ponto anterior (Figura 8).

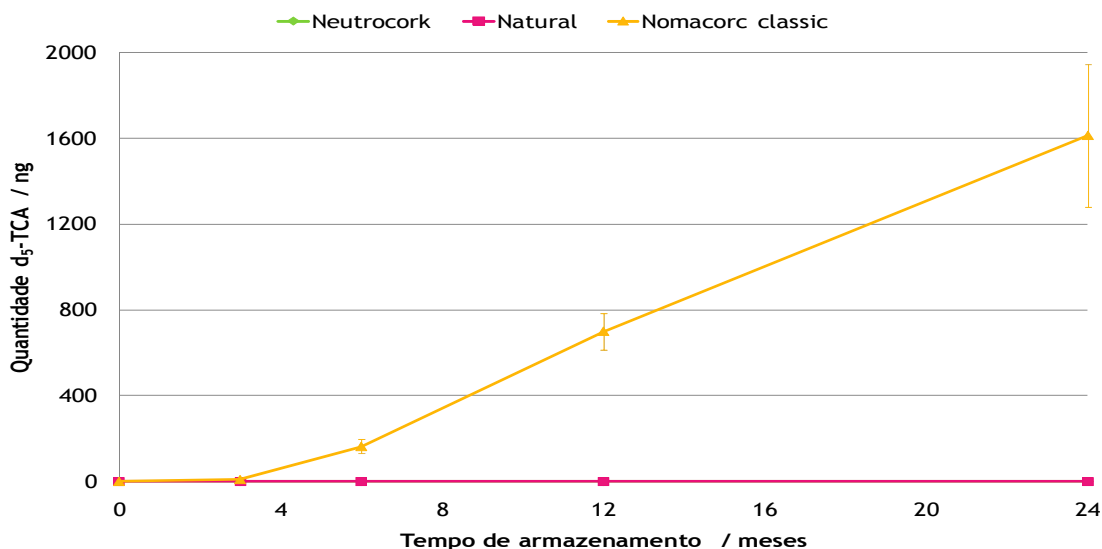


Figura 8 - Quantidade de d_5 -TCA presente nos vinhos engarrafados com diferentes tipos de vedantes.

Relativamente aos vedantes, observou-se que a quantidade d_5 -TCA na parte superior de cada um diminuiu entre os 12 e os 24 meses, contrariando deste modo a anterior tendência de aumento. Isto é, se compararmos o ponto de análise actual com o seu precedente encontramos uma redução na quantidade de d_5 -TCA de cerca de 40%. Esta redução pode ser explicada através do equilíbrio dinâmico que se estabelece entre a parte superficial da rolha e a atmosfera de contaminação. Provavelmente a superfície do vedante saturou e este factor conduziu ao equilíbrio, ou seja, o d_5 -TCA deixa de estar apenas a migrar para a solução hidroalcoólica como também passa do vedante para a atmosfera de contaminação (Figura 9a).

Na parte central das rolhas, não se observou qualquer contaminação quer para as de cortiça natural quer para as técnicas (Neutrocork), apesar de se ter detectada uma quantidade residual a 6 e 12 meses, nas rolhas de cortiça natural. A presença de contaminação nesses pontos deve-se provavelmente à forma como as rolhas foram seccionadas, ou seja, não se conseguiu seccionar em 3 partes iguais e a parte superior terá ficado ligeiramente menor. A quantidade de deutério que deveria estar associada à parte superior passa portanto a ser quantificada na parte central. No vedante Nomaticorc, apesar de existir uma pequena diminuição na quantidade de d_5 -TCA, pode-se dizer que este atingiu um equilíbrio da ordem dos 100 ng a partir dos 12 meses (Figura 9b).

Por fim, a análise efectuada à parte inferior dos vedantes mostra que os resultados obtidos aos 24 meses são semelhantes aos encontrados a 12 meses, ou seja, nas rolhas de cortiça natural e técnica (Neutrocork) não foi detectado d_5 -TCA enquanto o vedante Nomaticorc está contaminado com cerca de 100 ng (Figura 9c). Desta forma pode-se concluir que este último

vedante é completamente permeável a contaminantes exógenos, situação também encontrada nos pontos de análise anteriores.

Devido a problemas ocorridos na quantificação do $^{13}\text{C}_6\text{-TCP}$ não foi possível fazer uma correcta quantificação deste composto, pelo que estes resultados não serão apresentados.

À luz destes resultados podemos concluir que os vedantes sintéticos Nomaticorc são completamente permeáveis a compostos exógenos. Enquanto as rolhas de cortiça, natural e técnica, são barreiras efectivas à migração de compostos atmosféricos para o interior de garrafas de vinho. Estes resultados estão de acordo com as propriedades barreira ao oxigénio destes vedantes, propostas por Lopes *et al.* (2007). Vedantes permeáveis ao oxigénio, como o sintético Nomaticorc, serão também permeáveis a compostos voláteis da atmosfera.

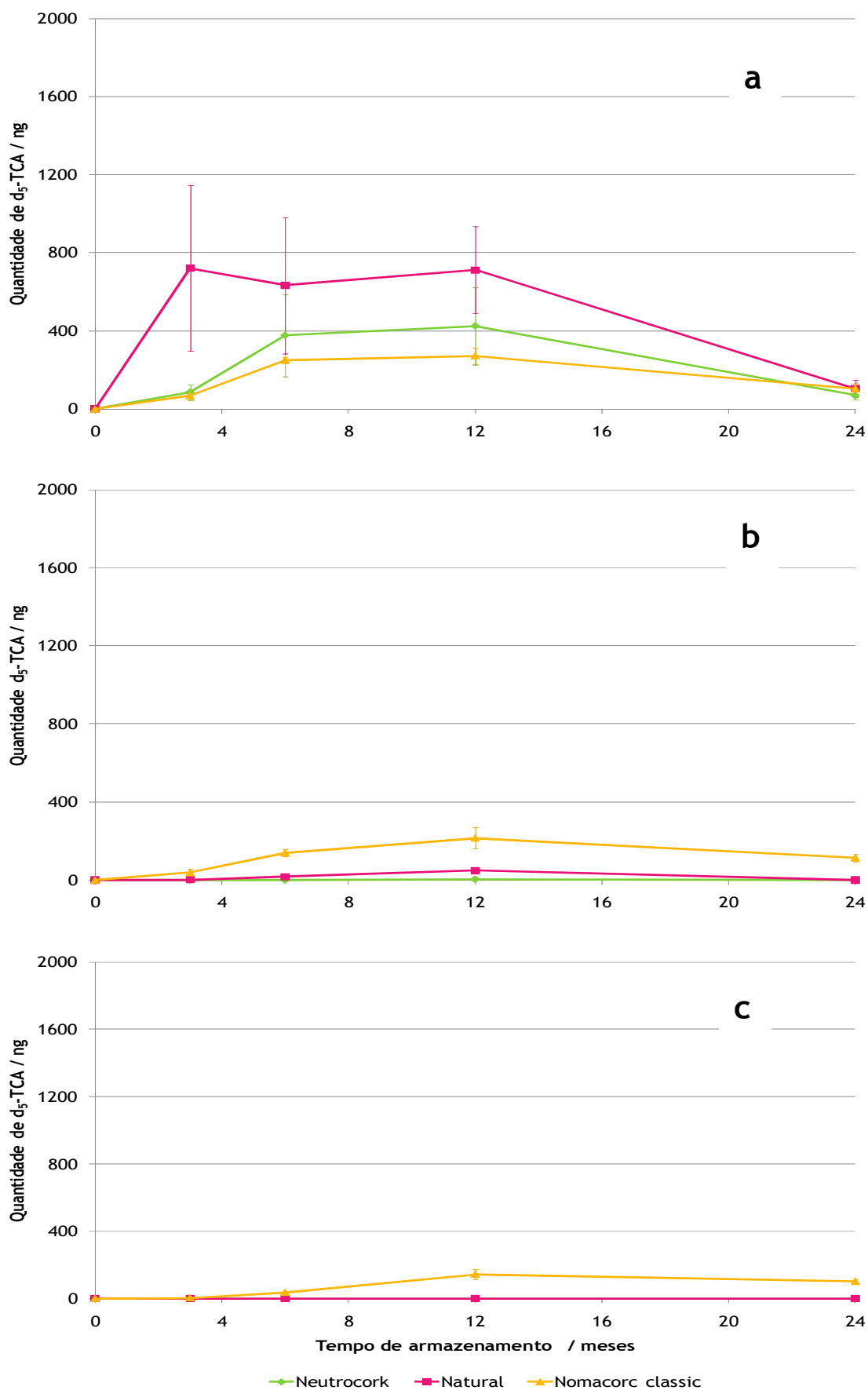


Figura 9 - Quantidade de d_5 -TCA presente nos diferentes tipos de vedantes: a) parte superior; b) parte central; c) parte inferior.

5 Estudo da migração de fenóis voláteis e cloroanisóis através de diferentes vedantes

Neste capítulo descreve-se o protocolo experimental seguido para o estudo da migração de cloroanisóis (d_5 -TCA, d_3 -TeCA e d_3 -PCA) e fenóis voláteis (d_4 -E4F e d_4 -E4G), através de rolhas de cortiça natural e técnica, vedantes sintéticos e cápsulas de rosca. Foi ainda alvo de estudo a possível influência da cápsula de PVC na migração dos compostos acima descritos através dos diferentes tipos de vedantes.

5.1 Material e métodos

O método utilizado para a quantificação dos cloroanisóis e fenóis voláteis foi optimizado e adaptado de Pimenta (2009). Este método despendia muito tempo para se fazer apenas uma análise, exigindo deste modo algumas alterações. Uma vez que a análise dos fenóis voláteis continuava a exigir um tempo considerável e devido a problemas inerentes ao aparelho, decidiu-se fazer a análise dos cloroanisóis e dos fenóis voláteis separadamente. As novas condições utilizadas na quantificação podem ser visualizadas no anexo 3. Todo o restante procedimento foi seguido por Pimenta (2009).

Neste estágio apenas se procedeu à análise correspondente ao ponto de 12 meses.

5.1.1 Contaminação atmosférica, engarrafamento e armazenamento

Em resumo, foram engarrafadas um total de 180 garrafas, 40 por cada tipo de vedante cilíndrico e 20 com cápsula de rosca. Das 40 garrafas com vedante cilíndrico, 20 foram revestidas com cápsula de PVC (apenas o gargalo) e as outras 20 foram deixadas sem qualquer protecção adicional.

Todas as garrafas foram em seguida colocadas em sacos de alumínio (883 mm x 1167mm) dentro de uma caixa de cartão (597 mm x 375 mm x 466 mm). No interior do saco foram colocadas 45 garrafas, 5 por cada modalidade (vedante com e sem cápsula de PVC) na posição horizontal. A contaminação propriamente dita foi realizada com a adição de 1 mL de cada solução contaminante em cada um dos 3 papéis de filtro (aleatoriamente distribuídos).

Relativamente aos cloroanisóis as concentrações usadas foram 61 mg.L^{-1} de $\text{d}_5\text{-TCA}$, 40 mg.L^{-1} de $\text{d}_3\text{-TeCA}$ e 42 mg.L^{-1} de $\text{d}_3\text{-PCA}$, com uma quantidade total teórica de $183 \text{ }\mu\text{g}$, $120 \text{ }\mu\text{g}$ e $126 \text{ }\mu\text{g}$, respectivamente. Quanto aos fenóis voláteis foi usada uma concentração de $60,1 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{d}_4\text{-E4F}$ e $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{d}_4\text{-E4G}$, com uma quantidade total teórica de 180 mg e 16 mg , respectivamente.

Após a contaminação, os sacos de alumínio foram rapidamente lacrados a quente e selou-se a caixa de cartão com fita-cola. As caixas foram em seguida armazenadas num local com a temperatura e humidade ambiente (condições não controladas) durante a duração do ensaio.

5.1.2 Análise dos cloroanisóis e fenóis voláteis no vinho e nos vedantes

Em cada período de armazenamento analisaram-se 45 garrafas, 5 por cada modalidade, sendo no total abrangidas 9 modalidades: duas por cada tipo de vedante cilíndrico (com e sem cápsula de PVC) e as cápsulas de rosca.

Abriu-se a caixa de cartão e o respectivo saco de alumínio, retirando-se as garrafas que foram imediatamente revestidas com papel de alumínio de forma a impedir possíveis perdas de contaminante. De modo a prevenir uma contaminação do laboratório, os frascos foram abertos e deixados ao ar durante 24 horas. O procedimento de corte e amostragem do vinho da garrafa foi realizado de acordo com o procedimento descrito no ponto 4 (anexo 3).

Os vedantes foram retirados dos gargalos após estes terem sido partidos com um martelo. De seguida, seccionou-se as rolhas em três partes iguais para podermos analisar a parte superior, central e inferior separadamente. Macerou-se individualmente cada uma destas partes, em frascos de 60 mL, com solução hidroalcoólica 12% (v/v) durante 24 horas (Figura 10).

A quantificação dos cloroanisóis e de fenóis voláteis foi realizada por GC-SMPE/MS e por GC-SPME/MS-MS, respectivamente.

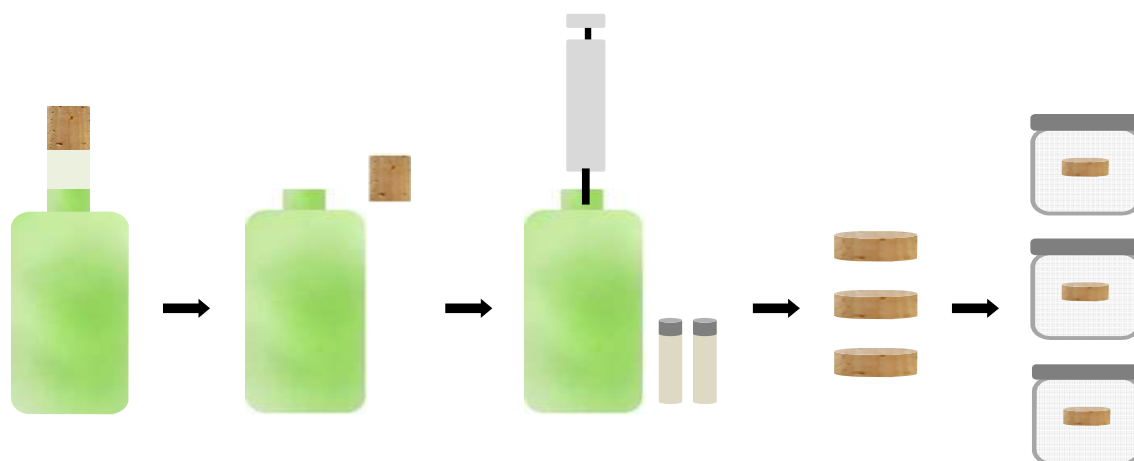


Figura 10 - Esquema representativo da metodologia usada na quantificação dos cloroanisóis e dos fenóis voláteis.

5.1.3 Análise de dados

O tratamento estatístico dos resultados foi feito recorrendo a uma aplicação informática implementada no *Microsoft Office Excel*, o *XLSTAT - Statistical Software*.

5.2 Resultados

Ao fim de 12 meses de armazenamento, verificou-se que a parte superior de todos os vedantes estava contaminada com d_5 -TCA (Figura 11a). Os vedantes sintéticos Nomaticorc Light e Nomaticorc Premium eram os que apresentavam uma maior contaminação com 6,5 ng e 6,6 ng, respectivamente. A cortiça técnica e a cortiça natural também apresentavam contaminação, contudo esta era cerca de metade da encontrada nos vedantes sintéticos, com 3,3 ng e 2,6 ng, respectivamente. As cápsulas de rosca foram incluídas nesta secção mas deve-se salientar que os resultados obtidos dizem respeito ao “*liner*”. Neste tipo de vedantes foi encontrada uma contaminação muito baixa, 0,8 ng, este resultado já era esperado uma vez que o “*liner*” tem uma espessura muito fina e é, portanto, facilmente atravessado pelos contaminantes. Relativamente à protecção adicional com as cápsulas de PVC, verificou-se que efectivamente havia uma diminuição na quantidade de d_5 -TCA presente em qualquer um dos vedantes cilíndricos.

Em relação à parte central das rolhas, apenas as Normacorc Light e Premium estavam contaminadas com 1,9 ng e 0,8 ng, respectivamente. Foram ainda encontrados traços de d_5 -TCA nos vedantes Nomaticorc Light e Premium revestidos com cápsula de PVC (figura 11b). Nas rolhas de cortiça, este composto não foi detectado.

Da análise da parte inferior dos vedantes observou-se que apenas o Nomatic Light apresentava contaminação com d_5 -TCA, cerca de 0,5 ng. Não foi possível detectar a presença de d_5 -TCA em qualquer outro vedante cilíndrico nem em quaisquer vedantes revestidos com cápsula de PVC (figura 11c).

Relativamente à contaminação do vinho com d_5 -TCA, apenas foi possível a sua detecção e quantificação nos vedantes Nomatic Light e nas cápsulas de rosca, 0,6 ng e 0,9 ng, respectivamente (figura 12). O facto de o vinho apresentar um valor sensivelmente superior ao encontrado na parte inferior dos vedantes, deve-se ao facto de os valores obtidos nos vedantes se referirem ao d_5 -TCA extraível, i.e. uma pequena percentagem (0,5-3%) da quantidade total de d_5 -TCA presente nesses materiais (Hervé *et al.*, 2000).

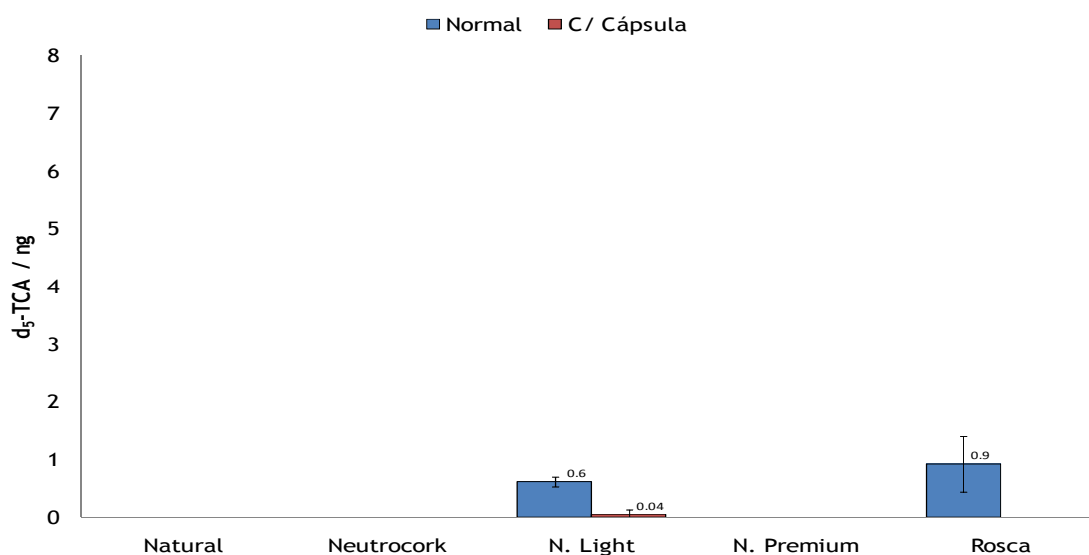


Figura 11 - Quantidade de d_5 -TCA presente no vinho.

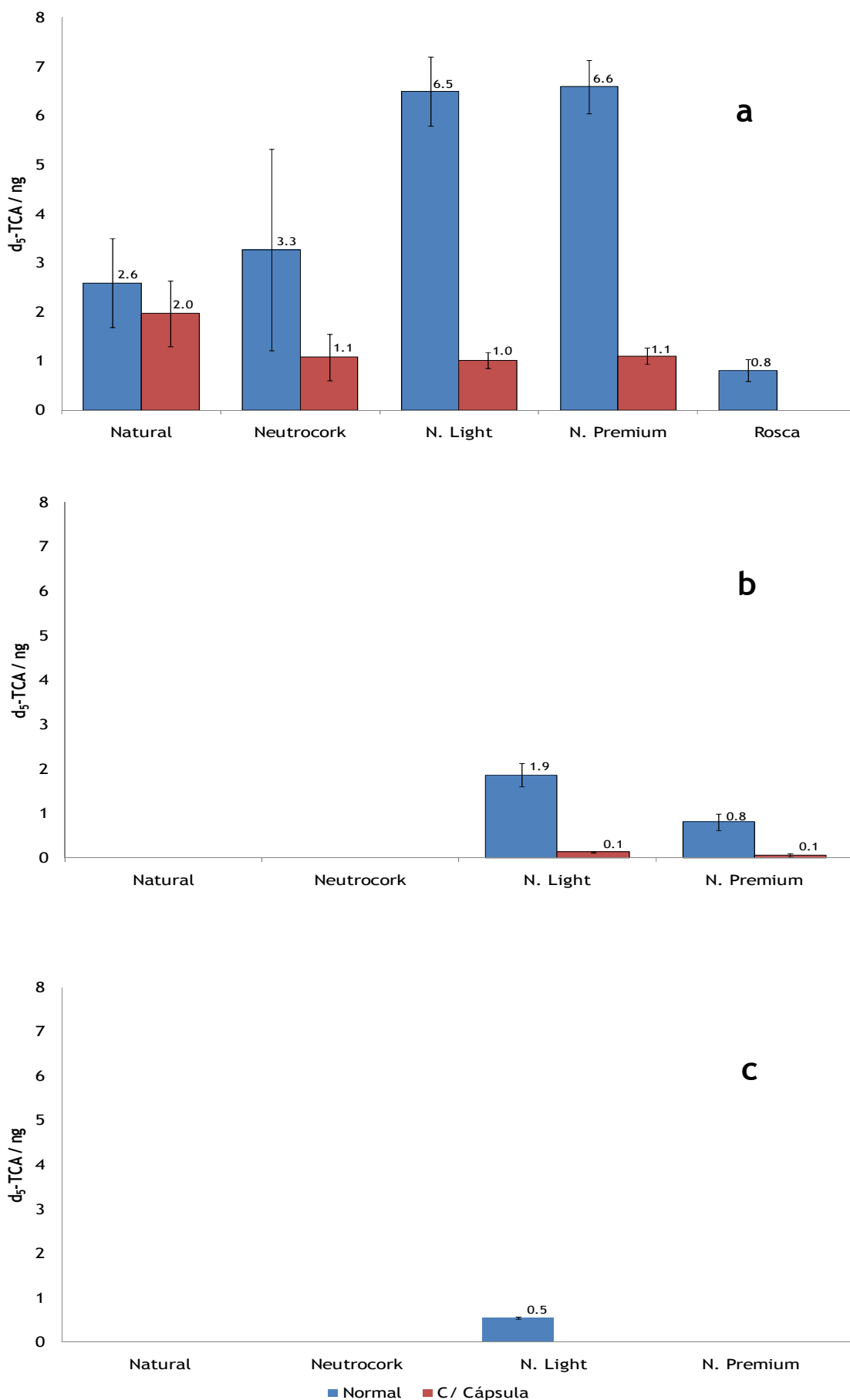


Figura 12 - Quantidade de d5-TCA presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.

Relativamente ao d_4 -E4F, observou-se que a parte superior dos vedantes apresentava-se bastante contaminada. Foi observada na cortiça natural e técnica uma quantidade de d_4 -E4F na ordem dos 8,5 μg e 29 μg , respectivamente. As cápsulas de rosca (“*liner*”) também apresentavam uma ligeira contaminação, cerca de 0,1 μg de d_4 -E4F. Os vedantes cilíndricos revestidos com cápsulas de PVC também apresentam uma contaminação, mas inferior aos respectivos sem a protecção adicional (Figura 14a).

Em relação à parte central, nas Nomatic Light foi detectado 1,8 μg de d_4 -E4F e 0,4 μg nas Nomatic Premium. Os vedantes Nomatic light com cápsula de PVC apresentavam também uma ligeira contaminação (Figura 14b).

Na parte inferior dos vedantes foi apenas detectada uma quantidade residual de d_4 -E4F nas rolhas Nomatic Light (Figura 14c).

Em relação à contaminação presente no vinho, apenas foi detectado d_4 -E4F nas garrafas vedadas com rolhas Nomatic Light e com cápsulas de rosca, 4,8 μg e 4,4 μg , respectivamente (Figura 13).

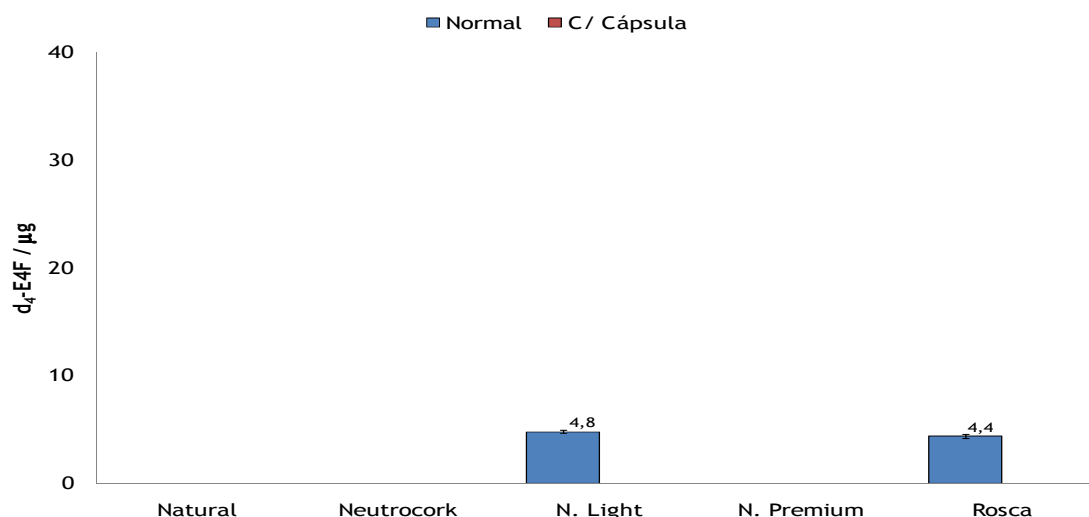


Figura 13 - Quantidade de d_4 -E4F presente no vinho.

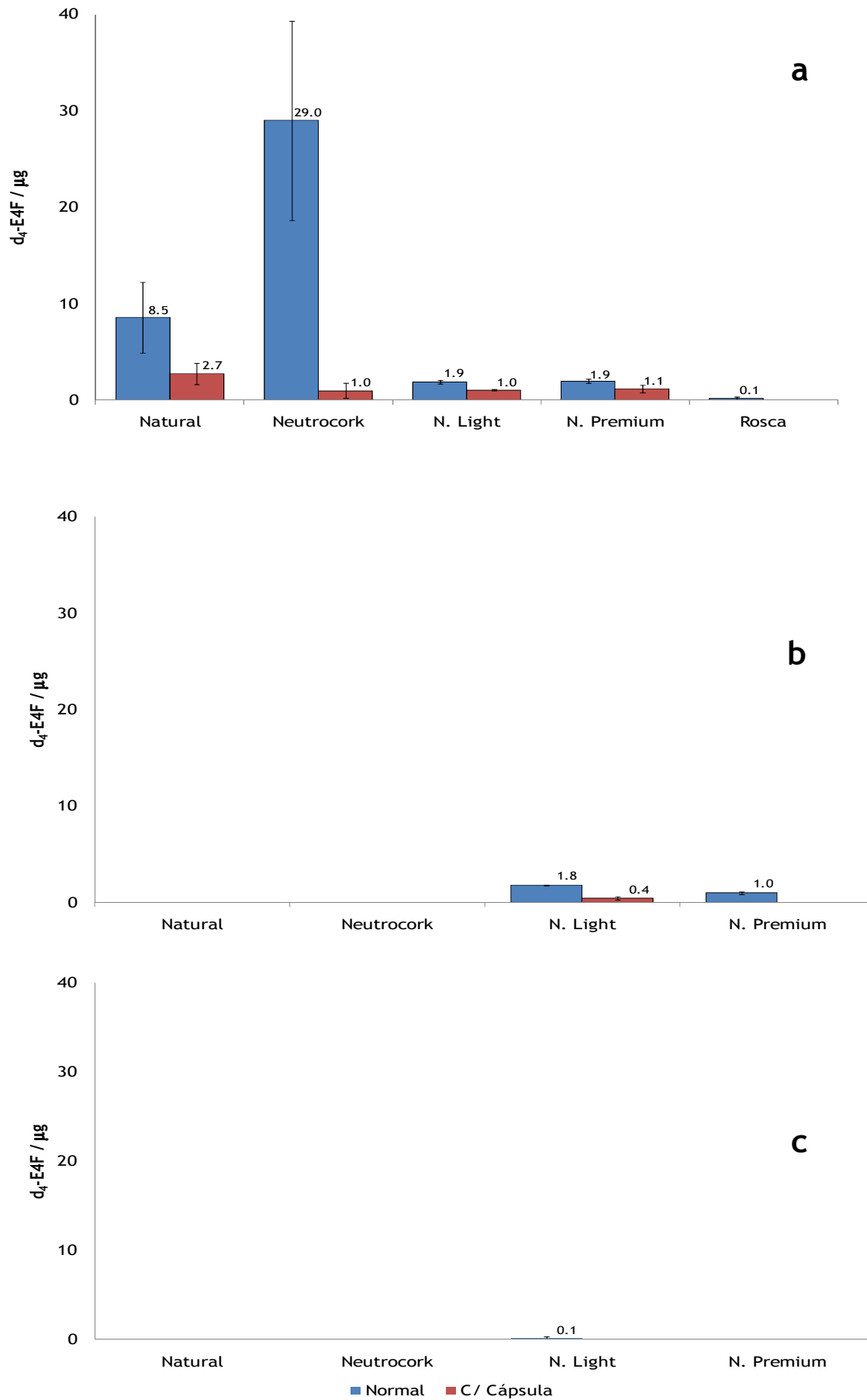


Figura 14 - Quantidade de d_4 -E4F presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.

No que diz respeito ao d_5 -E4G, na parte superior dos vedantes encontraram-se as maiores quantidades. A cortiça técnica e natural apresentavam níveis de contaminação de 4,5 μg e 1,8 μg , respectivamente. Os vedantes sintéticos, Nomatic Light e Premium apresentavam 2,7 ng e 2,3 ng de d_5 -E4G, respectivamente (Figura 15a). Mais uma vez se pode confirmar a protecção adicional conferida pelas cápsulas de PVC, uma vez que os valores obtidos são significativamente menores nos vedantes capsulados ($p=0,05$). Não foi detectada a presença de d_5 -E4G no “liner” das cápsulas de rosca.

Relativamente à parte central dos vedantes, foram encontradas 2,2 μg de d_5 -E4G nas Nomatic Light e 0,8 μg nas Premium. Tal como nos compostos anteriores, apenas se observou contaminação na parte central dos vedantes sintéticos (Figura 15b).

Por fim, na parte inferior dos vedantes apenas foi detectado d_5 -E4G nos vedantes Nomatic Light, principalmente na ausência cápsula de PVC (Figura 15c).

Todos os vinhos analisados não mostraram a presença de d_5 -E4G para qualquer tipo de vedante, com ou sem protecção da cápsula de PVC.

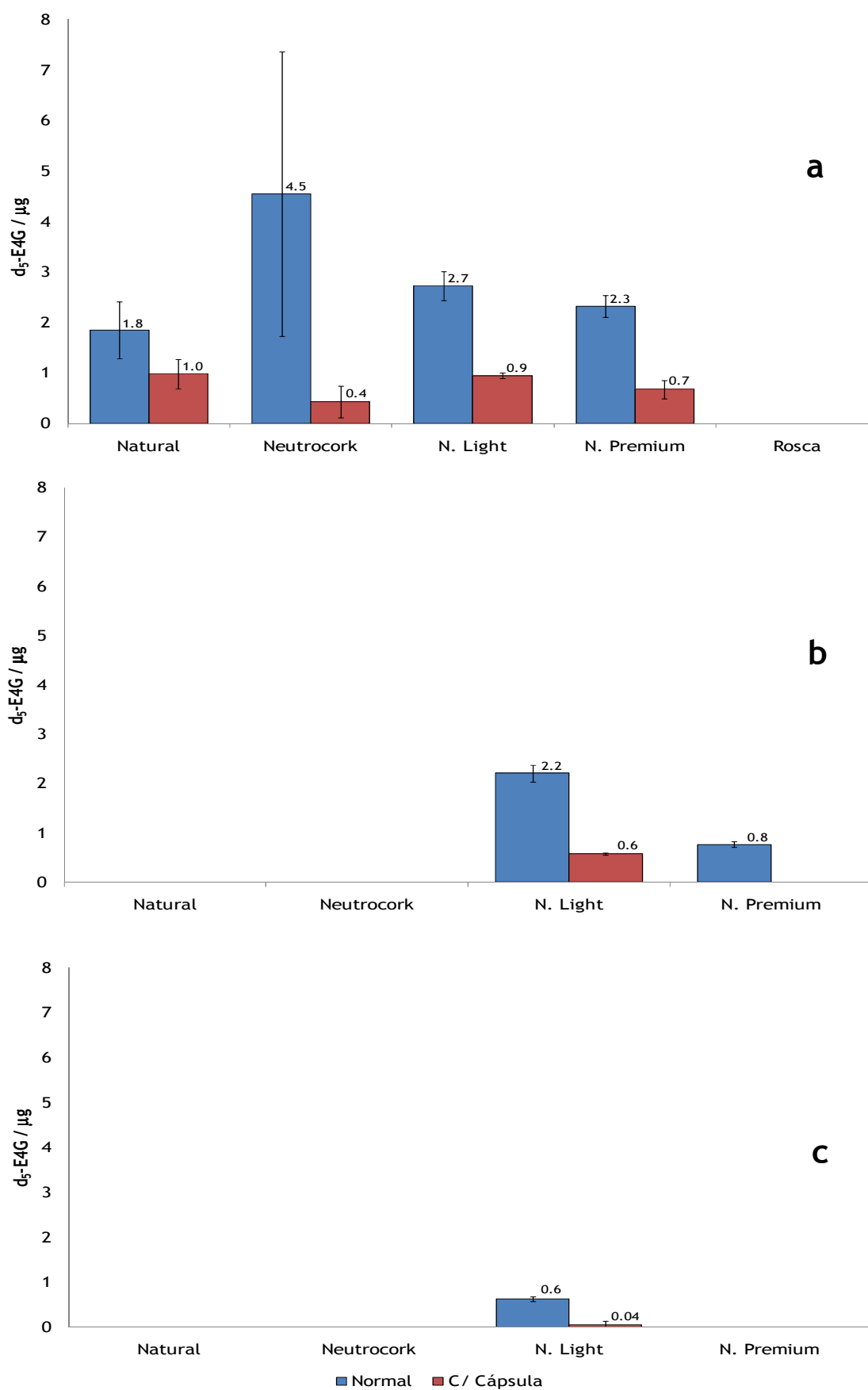


Figura 15 - Quantidade de d_5 -E4G presente nos vedantes: a) parte superior; b) parte central; parte inferior.

Não foi possível a detecção do composto d_3 -PCA uma vez que este composto apresenta uma volatilidade muito inferior à dos outros compostos analisados. Relativamente ao d_3 -TeCA, a sua detecção foi possível contudo devido a problemas ocorridos na sua quantificação não será possível fazer uma avaliação desses resultados.

À luz dos resultados obtidos, podemos concluir que as rolhas de cortiça natural e as rolhas de cortiça técnica são barreiras efectivas à passagem de contaminantes para o vinho, ao invés dos vedantes sintéticos e cápsulas de rosca que permitem a sua passagem. É de salientar ainda o facto que o revestimento com cápsulas de PVC confere uma protecção adicional à contaminação com cloroanisóis e fenóis voláteis.

Estes resultados estão de acordo com as propriedades barreira ao oxigénio dos diferentes vedantes. Assim como os resultados obtidos no capítulo 4.

6 Conclusões

O presente trabalho estudou a migração de cloroanisóis e fenóis voláteis através de diferentes vedantes (cortiça natural, vedantes sintéticos e cápsulas de rosca) com e sem cápsula de PVC. Garrafas de vinho e de solução hidrolacólica foram vedadas com diferentes vedantes e conservadas em ambientes altamente contaminados com diferentes cloroanisóis e fenóis voláteis. A migração interna de cloroanisóis, nomeadamente de tricloroanisol, ao longo da rolha de cortiça foi também estudada.

Ao fim de 12 e 24 meses de armazenamento, conclui-se que as rolhas de cortiça, natural e técnica, são barreiras efectivas à passagem de diferentes contaminantes exógenos. Por outro lado, os vedantes sintéticos e cápsulas de rosca saranex são completamente permeáveis a esses mesmos contaminantes. A presença de uma cápsula de PVC sobre os diferentes vedantes confere-lhes uma protecção suplementar, sem no entanto, impedir completamente a migração destes compostos.

O tricloroanisol não é susceptível de migrar do interior da cortiça para o vinho durante os primeiros 24 meses de conservação, o que sugere que a contaminação do vinho apenas ocorre se este estiver em contacto com a zona da rolha contaminada.

7 Avaliação do trabalho realizado

7.1 Objectivos Realizados

Este projecto teve como objectivo estudar a migração de d_5 -TCA e $^{13}C_6$ -TCP presentes numa atmosfera contaminada através dos vedantes para o vinho (ponto de análise aos 24 meses) e ainda a migração de d_5 -TCA do interior de uma rolha de cortiça artificialmente contaminada para o vinho (ponto de análise aos 24 meses).

Foi ainda objectivo de estudo a migração de d_5 -TCA, d_3 -TeCA, d_3 -PCA, d_4 -E4F e d_4 -E4G através de diferentes vedantes para o vinho, assim como o efeito da aplicação de uma cápsula de PVC.

7.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante toda a duração do estágio houve inteira colaboração com o laboratório de controlo de qualidade do departamento de I & D da Amorim & Irmãos, de modo a auxiliar em todos os trabalhos de rotina diária do laboratório.

Das tarefas realizadas menciona-se as seguintes: preparação de amostras de rotina para análise do TCA, preparação de soluções mãe, análises de TBA, TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP e PCP em amostras de rotina e em reclamações de clientes.

Desenvolvimento e optimização dos métodos cromatográficos para análise de cloroanisóis e fenóis voláteis com diferentes sistemas de detecção. Participação activa no planeamento e execução do estudo da contaminação de cortiça com TCA em sobreiros.

7.3 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo do projecto surgiram alguns problemas técnicos, assim como limitações na utilização de equipamento devido às necessidades prioritárias das análises de rotina do laboratório. A realização de todas as tarefas inerentes ao trabalho exigiu uma eficiente articulação funcional do trabalho em equipa.

Sendo os estudos propostos de longa duração não foi possível a conclusão dos mesmos, contudo deixou-se assegurada as condições necessárias para a sua continuação por parte da empresa. Em função dos resultados obtidos para os fenóis voláteis ao fim de 12 meses, aconselho que a última análise seja realizada ao fim de 36 meses. Uma vez que só é possível a execução de uma única análise, de forma a garantir que os resultados sejam mais semelhantes ao que realmente acontece num engarrafamento de vinho.

7.4 Apreciação final

O presente estudo apresenta-se como uma contribuição importante para o esclarecimento dos mecanismos de contaminação do vinho engarrafado com diferentes vedantes. A compreensão global deste problema é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes na sua resolução. O efeito barreira das rolhas de cortiça natural e a efectiva migração dos vedantes sintéticos e cápsula de rosca serão fortes argumentos de marketing para a promoção da utilização de rolhas de cortiça como vedantes de vinho, tanto para a Amorim & Irmãos S.A. como para todo o sector corticeiro.

Do ponto de vista da valorização pessoal, salienta-se a oportunidade de ter integrado a rotina de uma empresa e as amizades e o companheirismo nesta criada. A grande variedade de actividades realizadas durante o estágio permitiu amplificar a experiência bem como alargar os conhecimentos sobre as áreas envolvidas. Sem dúvida, esta etapa do meu percurso académico constituiu uma experiência muito enriquecedora e marcante quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

Referências

- Amon, J.M., Simpson, R.F., *Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance*, Australian Grapegrower and Winemaker, 286, 63-80, 1986;
- APCOR, *Anuário da Associação Portuguesa de Cortiça*, 2009.
- Barker, D.A., Capone, D.L., Pollnitz, A.P., Mclean, H.J., Francis, I.L., Oakey, H., Sefton, M.A., *Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 7, 40-46, 2001.
- Boutou, S., Chatonnet, P., *Rapid headspace solid-phase microextraction/gás chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the mais odorants causing off-flavours in wine*, Journal of Chromatography A, 1141, 1-9, 2007.
- Buser, H.R., Zanier, C., Tanner, H., *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30, 359-362, 1982.
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Barker, D.A., McLean, H.J., Pollnitz, A.P., 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, G.K., 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., Bouton, S., 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.
- Coelho, J., *Migração de TCA e TCP através de diferentes vedantes. Influência da barreira Acquamark*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Coque, J.J.R., Pérez, E.R., Goswami, M., Martínez, R.F., García, S.C., Rodríguez, M.L.A., 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, 1-66, Santa Maria de Lamas, Portugal, 2006.

- Coque, J.J.R., Rodríguez, M.L.A., Goswami, M., Martínez, R.F., *Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles)*, INBIOTEC, ASECOR, 7-26, Espanha, 2006.
- Fortes, M.A., Rosa, M.E., Pereira, H., *A cortiça*, 2ª edição, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2006.
- Hervé, E., Price, S., Burns, G., Weber, P., *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for nature corks*, The Cork Quality Council, <http://www.corkqc.com> (Maio 2000).
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulos, D., Mclean, H.J., Sefton, M.A., *The location of 2,4,6-trichloroanisoles in a batch of contaminated wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 3, 141-145, 1997.
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulos, D., McLean, H.J., Sefton, M.A., *The location of 2,4,6-trichloroanisoles in a batch of contaminated wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 3, 141-145, 1997.
- Lino, J.M., Migração de d5-TCA através de vedantes em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Loureiro, V., Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade, Revista dos Vinhos, 42-46, 1996.
- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M., *Spoilage yeasts in the wine industry*, International Journal of Food Microbiology 86, 23-50, 2003.
- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M., *Spoilage activities of Dekkera/Brettanomyces spp*, Blackburn, C. (ed.) Food spoilage microorganisms, Woodhead Pubs, Cambridge, 354-398, 2006.
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J., Loureiro, V., *Infecting yeasts in Portuguese bottled white wines*, Proceedings of the XIIIth International Symposium on Yeasts, Leuven, Belgium, 34-35, 1989.
- Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N. e Loureiro, V., *The influence of oxygen on the "horse sweat taint" in red wines*, Actas do 7th International Enology Symposium, 1 a 2 Junho, Pavia, Itália; 2000.
- Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N. e Loureiro, V., *The influence of oxygen on the "horse sweat taint" in red wines*, Italian Food Bev. Technol., 24, 34-38, 2001.

- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L., Glories, Y., *Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 6741-6746, 2006.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L., Glories, Y., *Main routes of oxygen ingress through different closures into wine bottles*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 5167-5170, 2007.
- Lopes, T., *Estudos de migração de 2,4,6-tricloroanisol através de vedantes*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Pereira, C.S., Danesh, P., Marques, J.J.F., Romão, M.V.S., *O gosto a rolha em vinhos - estado actual dos conhecimentos*, Ciência Téc. Vitiv., 14 (2), 79-99, 1999.
- Pimenta, M., *Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes e embalagem*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Pollnitz, A.P., Pardon, K.H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G.K., 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.
- Sampaio, J.M., *Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Sefton, M.A., Simpson, R.F., *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 226-240, 2005.
- Simpson, R.F., *Cork taint in wines: a review of the causes*, Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 5, 286-296, 1990.
- Simpson, R.F., Sefton, M.A., *Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 13, 106-116, 2007.
- Riboulet, J.M., Alves, L.A.R., Urreizti, N., *Quantificação dos cloroanisóis por micro extracção em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrometria de massa (MS) em macerados de lotes de rolha de cortiça ou em vinhos*, Ciência Téc. Vitiv., 17 (2), 61-71, 2002.
- Steinke, R. D. and Paulson, M.C., *The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain*, Agricultural and Food Chemistry, 12, 381-387, 1964.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 - Contaminação artificial

Método de análise

- GC-SPME/MS-MS: micro extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Equipamento utilizado

- Cromatógrafo gasoso: Varian CP - 3800

Preparação de soluções:

- Solução hidroalcoólica 6% (v/v): adicionar 120 mL de etanol 96% num balão volumétrico de 2 L e perfazer o volume com água destilada.
- Solução hidroalcoólica 12% (v/v): adicionar 240 mL de etanol 96% num balão volumétrico de 2 L e perfazer o volume com água destilada.
- Solução de carbonato de potássio (0.1M): adicionar 27,64 g de carbonato de potássio num balão volumétrico de 2 L e perfazer o volume com solução hidroalcoólica 6% (v/v).

Procedimento

- Preparação das amostras das macerações: Colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 mL o vedante (ou parte dele) que se pretende analisar, perfazer o volume do mesmo com solução hidroalcoólica 12% (v/v); cobrir o topo do frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa; deixar macerar durante 24 horas à temperatura ambiente.

- Preparação das amostras das macerações: pipetar 5 mL da solução resultante das macerações e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo ± 2 g de NaCl (permite a saturação do líquido); adicionar 100 μ L de padrão interno (d_5 -TBA); agitar a amostra para promover a mistura.
- Preparação das amostras dos vinhos: pipetar 5 mL do vinho e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo ± 2 g de NaCl (permite a saturação do líquido); adicionar 100 μ L de padrão interno (d_5 -TBA); agitar a amostra para promover a mistura.

Análise dos diferentes compostos nas amostras por SPME-CG/MS

Tabela 3 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa.

Composto	Tipo	lão / z	* ARABIC □ 23lão / / min	Concentração / ng.L ⁻¹	Limite Quantificação / ng.L ⁻¹
d_5 -TCA	Contaminante	215	5,892	-	1
d_5 -TBA	Padrão interno	349	9,327	20	-
d_5 -TBA	Padrão interno	349	9,327	500	-

O limite de quantificação de cada composto é calculado através da quantificação de 10 amostras com concentração igual à do primeiro ponto utilizado para fazer a curva de calibração; para averiguar se realmente é limite de quantificação calcula-se a média das concentrações obtidas que deve estar próximo da concentração que usamos e o coeficiente de variação tem de ser inferior a 10%

Análises e condições de detecção

- Temperatura do injector: 270 °C
- Tempo pré-incubação: 3 min
- Temperatura de pré-incubação: 55 °C
- RPM pré-incubação: 500 RPM
- Tempo de extracção: 11 min
- RPM extracção: 250 RPM
- Tempo de desorção da fibra: 4 min

- Temperatura de desorção da fibra: 270 °C
- Programa de temperaturas:

Tabela 4 - Programa de temperaturas.

Rate / °C.min ⁻¹	Temperatura / °C
-	90
10	205
30	280

Calibração

- É necessário efectuar rectas de calibração para as gamas de concentração de interesse de forma a ser possível a quantificação dos compostos que se pretende analisar. Aconselha-se a realização de curvas sempre que se alterem as condições do GC, ocorram reparações técnicas ou no início de uma nova análise
- Realizou-se rectas de calibração para o d₅-TCA: solução em matriz de vinho 6% (v/v), para a quantificação dos vinhos, e solução de hidroalcoólica 6% (v/v), para a quantificação dos macerados. Foram ainda utilizados padrões de controlo com a mesma matriz e em concentrações adequadas.

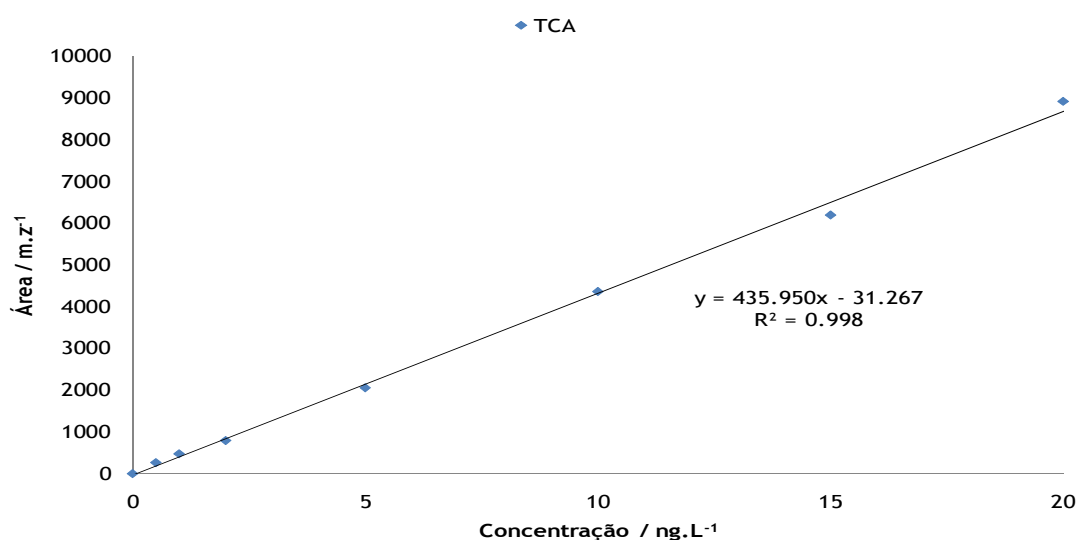


Figura 16 - Curva de calibração do d₅-TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.

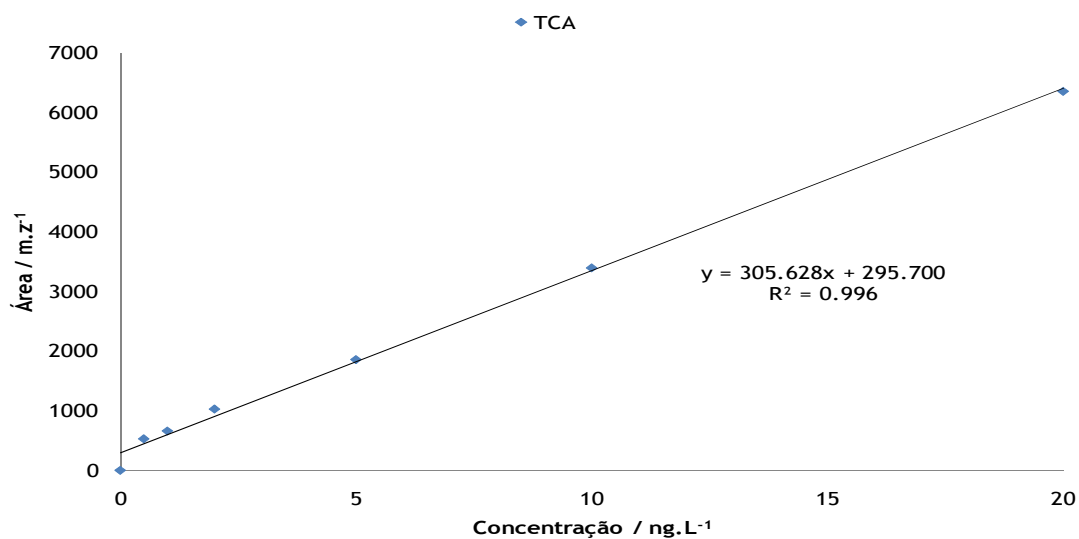


Figura 17 - Curva de calibração para o d₅-TCA em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.

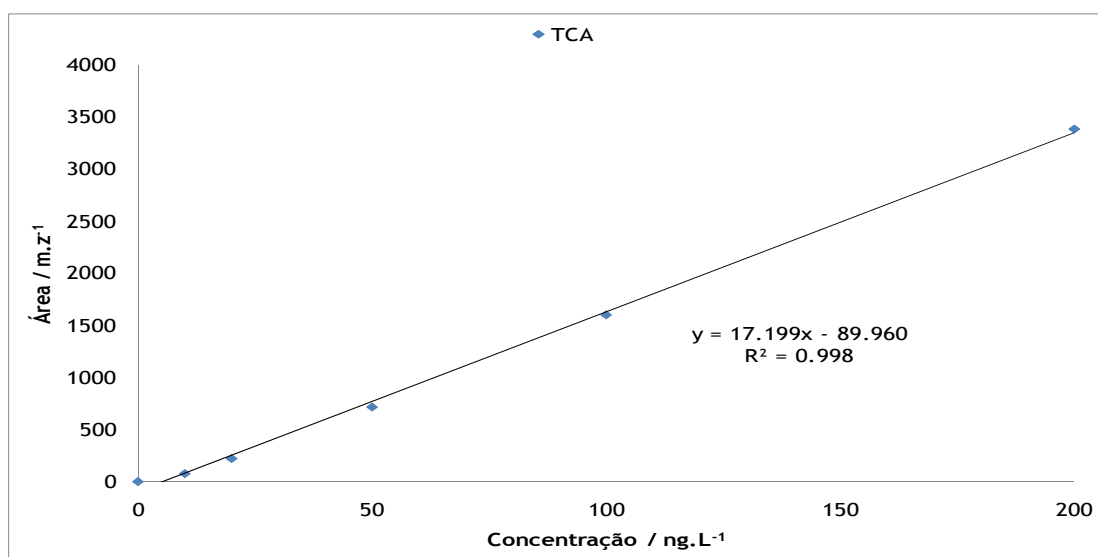


Figura 18 - Curva de calibração para o d₅-TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.

Tratamento de resultados

- Para quantificar os compostos é necessário integrar os picos correspondentes ao padrão interno e ao contaminante a analisar. Assim obtém-se, para cada amostra, a

área do pico cromatográfico do contaminante (A_{cont}) e a área do pico cromatográfico do respectivo padrão interno ($A_{p.i.}$). Posteriormente, calcula-se o valor médio das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno ($A_{média\ p.i.}$) para se corrigir o valor das áreas dos picos cromatográficos dos contaminantes (A_{cont}^*) com base na equação (1.1).

- Para se obter o valor da concentração do contaminante (C_{cont}), é necessário substituir o valor da área dos picos cromatográficos corrigida (A_{cont}^*) na equação da curva de calibração (1.2 e 1.3).

$$A_{cont}^* = \frac{A_{média\ p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (1.1)$$

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (1.2)$$

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (1.3)$$

Condições de engarrafamento

- Encontram-se descritas em Lopes (2008)

Propriedades físico-químicas do vinho

- Encontram-se descritas em Lopes (2008)

Propriedades físicas das rolhas

- Encontram-se descritas em Lopes (2008)

8.2 Anexo 2 - Migração atmosférica de TCA e TCP

Método de análise

- SPME/GC-MS: micro extracção em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Equipamento utilizado

- Cromatógrafo gasoso: Shimadzu GCMS - QP 2010 Plus

Procedimento

- Preparação das macerações: Colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 mL o vedante (ou parte dele) que se pretende analisar, perfazer o volume do mesmo com solução de carbonato de potássio de concentração igual a $13,8 \text{ g.L}^{-1}$; cobrir o topo do frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa; deixar macerar durante 24 horas à temperatura ambiente.
- Preparação das amostras das macerações: pipetar 5 mL da solução resultante das macerações e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo $\pm 2\text{g}$ de NaCl (permite a saturação do liquido); adicionar 100 μL de padrão interno ($\text{d}_5\text{-TBA}$) e 100 μL de Ácido Anidrido Acético (agente de derivatização); agitar a amostra para promover a mistura.
- Preparação das amostras dos vinhos: pipetar 5 mL da solução hidroalcólica e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo $\pm 2\text{g}$ de NaCl (permite a saturação do liquido); adicionar 100 μL de padrão interno ($\text{d}_5\text{-TBA}$), 100 μL de ácido anidrido acético (agente de derivatização) e 200 μL de carbonato de potássio (5M); agitar a amostra para promover a mistura.

Análise dos diferentes compostos nas amostras por SPME-CG/MS*Tabela 5 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa.*

Composto	Tipo	lão / z	Tempo Retenção / min	Concentração / ng.L ⁻¹	Limite Quantificação / ng.L ⁻¹
d ₅ -TCA	Contaminante	215	6,15	-	1
d ₃ -TeCA	Contaminante	249	8,60	-	5
d ₃ -PCA	Contaminante	283	10,85	-	5
d ₅ -TBA	Padrão interno	349	9,65	20	-
d ₅ -TBA	Padrão interno	349	9,65	500	-

O limite de quantificação de cada composto é calculado através da quantificação de 10 amostras com concentração igual à do primeiro ponto utilizado para fazer a curva de calibração; para averiguar se realmente é limite de quantificação calcula-se a média das concentrações obtidas que deve estar próximo da concentração que usámos e o coeficiente de variação tem de ser inferior a 10%

Análises e condições de detecção

- Temperatura do injector: 270 °C
- Tempo pré-incubação: 3 min
- Temperatura de pré-incubação: 55 °C
- RPM pré-incubação: 250 RPM
- Tempo de extracção: 11 min
- RPM extracção: 250 RPM
- Tempo de desorção da fibra: 4 min
- Temperatura de desorção da fibra: 270 °C
- Programa de temperaturas:

Tabela 6 - Programa de temperaturas.

Rate / °C.min ⁻¹	Temperatura / °C
-	90
10	205
30	280

Calibração

- É necessário efectuar rectas de calibração para as gamas de concentração de interesse de forma a ser possível a quantificação dos compostos que se pretende analisar. Aconselha-se a realização de curvas sempre que se alterem as condições do GC, ocorram reparações técnicas ou no início de uma nova análise
- Realizou-se rectas de calibração para todos os compostos em duas matrizes diferentes: solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a quantificação dos vinhos, e solução de carbonato de potássio, para a quantificação dos macerados. Foram ainda utilizados padrões de controlo com a mesma matriz e em concentrações adequadas.

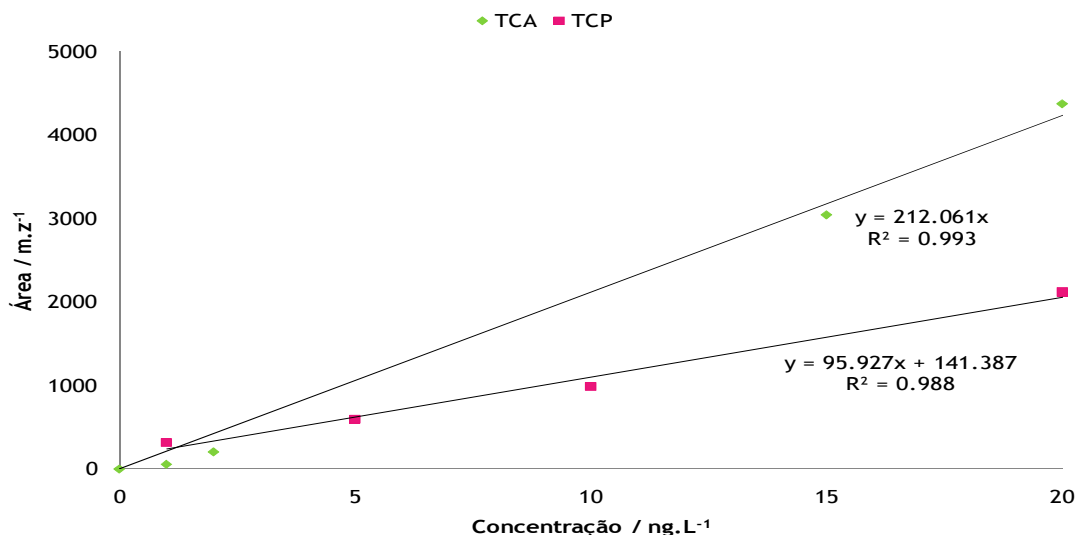


Figura 19 - Curva de calibração do d5-TCA e ¹³C₆-TCP em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.

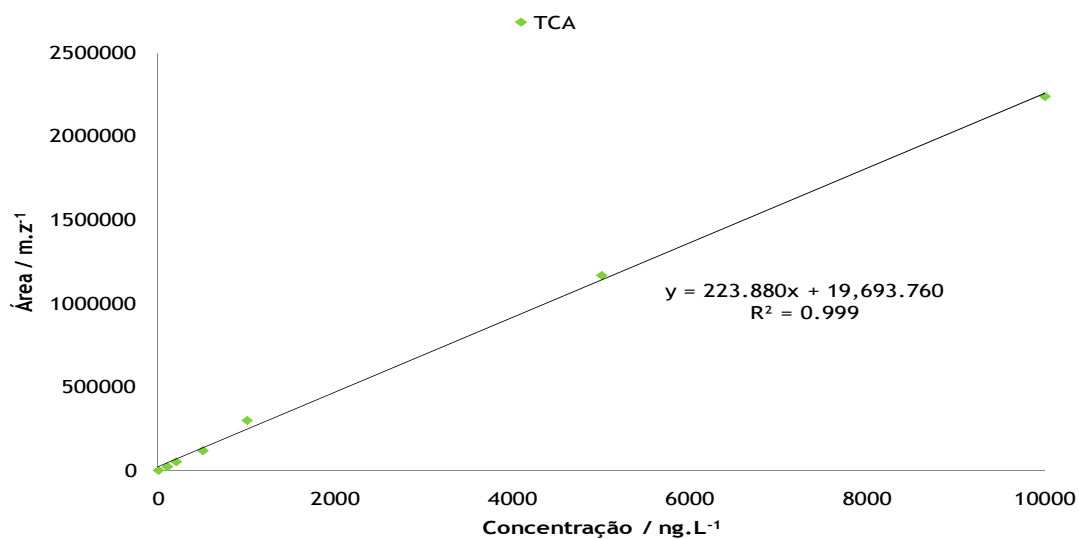


Figura 20 - Curva de calibração do d_5 -TCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 10000 ng.L⁻¹.

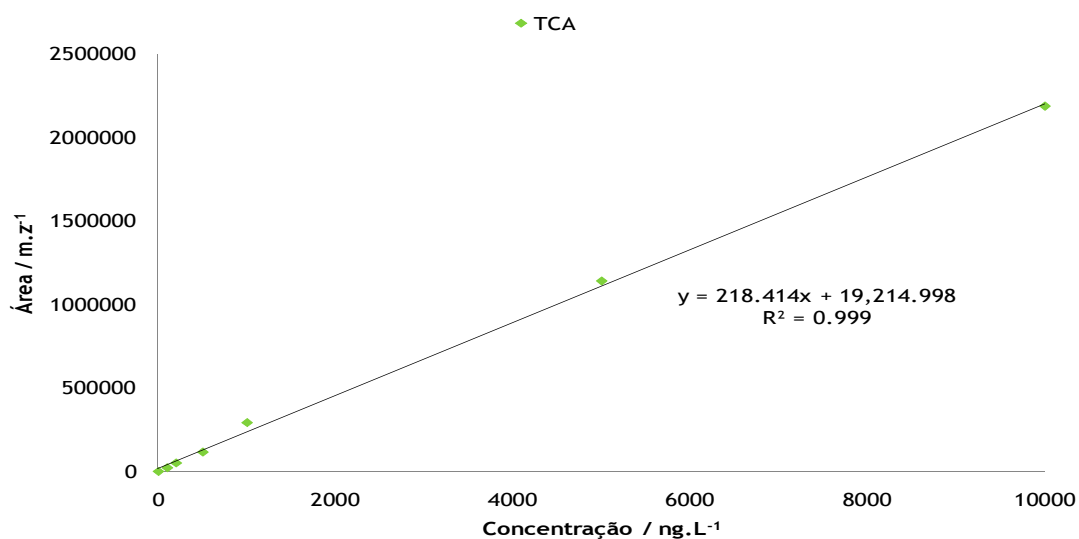


Figura 21 - Curva de calibração do d_5 -TCA em solução de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 10000 ng.L⁻¹.

Tratamento de resultados

- Para quantificar os compostos é necessário integrar os picos correspondentes ao padrão interno e ao contaminante a analisar. Assim obtém-se, para cada amostra, a

área do pico cromatográfico do contaminante (A_{cont}) e a área do pico cromatográfico do respectivo padrão interno ($A_{p.i.}$). Posteriormente, calcula-se o valor médio das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno ($A_{média\ p.i.}$) para se corrigir o valor das áreas dos picos cromatográficos dos contaminantes (A_{cont}^*) com base na equação (1.1).

- Para se obter o valor da concentração do contaminante (C_{cont}), é necessário substituir o valor da área dos picos cromatográficos corrigida (A_{cont}^*) na equação da curva de calibração (1.2 e 1.3).

$$A_{cont}^* = \frac{A_{média\ p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (1.1)$$

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (1.2)$$

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (1.3)$$

Condições de engarrafamento

- Encontram - se descritas em Lopes (2008)

8.3 Anexo 3 - Migração atmosférica de cloroanisóis e fenóis voláteis

Método de análise

- ❖ Cloroanisóis
 - SPME-GC/MS: micro extracção em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
- ❖ Fenóis Voláteis
 - GC-SPME/MS-MS: micro extracção em fase sólida e espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massa

Equipamento utilizado

- ❖ Cloroanisóis
 - Cromatógrafo gasoso: Shimadzu GCMS - QP 2010 Plus
- ❖ Fenóis voláteis
 - Cromatógrafo gasoso: Varian CP - 3800

Procedimento

- Preparação das amostras das macerações: colocar num frasco de vidro com capacidade de 60 mL o vedante (ou parte dele) que se pretende analisar, perfazer o volume do mesmo com solução hidroalcoólica 12% (v/v); cobrir o topo do frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa; deixar macerar durante 24 horas à temperatura ambiente.
- Preparação das amostras das macerações: pipetar 5 mL da solução resultante das macerações e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo $\pm$ 2g de NaCl (permite a saturação do liquido); adicionar 100 μ L de padrão interno d5-TBA (cloroanisóis) ou 50 μ L de padrão interno d10-E4F (fenóis voláteis); agitar a amostra para promover a mistura.

- Preparação das amostras dos vinhos: pipetar 5 mL de vinho e 5 mL de água destilada para um vial de 20 mL contendo $\pm$ 2g de NaCl (permite a saturação do líquido); adicionar 100 μ L de padrão interno d5-TBA (cloroanisóis) ou 50 μ L de padrão interno d10-E4F (fenóis voláteis); agitar a amostra para promover a mistura.

Análise dos diferentes compostos nas amostras por SPME-CG/MS

Tabela 7 - Parâmetros para análise dos diferentes cloroanisóis e bromoanisóis por cromatografia gasosa

Composto	Tipo	Íon / z	Tempo Retenção / min	Concentração / ng.L ⁻¹	Limite Quantificação / ng.L ⁻¹
d ₅ -TCA	Contaminante	215	6,15	-	1
d ₅ -TBA	Padrão interno	349	9,65	20	-
d ₅ -TBA	Padrão interno	349	9,65	500	-

Tabela 8 - Parâmetros para análise dos diferentes fenóis voláteis por cromatografia gasosa.

Composto	Tipo	Íon / z	Tempo Retenção / min	Concentração / μ g.L ⁻¹	Limite Quantificação / μ g.L ⁻¹
d ₄ -E4F	Contaminante	111	8,435	-	10
d ₅ -E4G	Contaminante	139	8,417	-	5
d ₁₀ -E4F	Padrão interno	113	15,260	500	-

O limite de quantificação de cada composto é calculado através da quantificação de 10 amostras com concentração igual à do primeiro ponto utilizado para fazer a curva de calibração; para averiguar se realmente é limite de quantificação calcula-se a média das concentrações obtidas que deve estar próximo da concentração que usamos e o coeficiente de variação tem de ser inferior a 10%.

Análises e condições de detecção

❖ Cloroanisóis

- Temperatura do injector: 270 °C
- Tempo pré-incubação: 3 min
- Temperatura de pré-incubação: 55 °C
- RPM pré-incubação: 250 RPM
- Tempo de extracção: 11 min
- RPM extracção: 250 RPM
- Tempo de desorção da fibra: 4 min
- Temperatura de desorção da fibra: 270 °C
- Programa de temperaturas:

Tabela 9 - Programa de temperaturas.

Rate / °C.min ⁻¹	Temperatura / °C
-	90
10	205
30	280

❖ Fenóis voláteis

- Temperatura do injector: 270 °C
- Tempo pré-incubação: 3 min
- Temperatura de pré-incubação: 55 °C
- RPM pré-incubação: 500 RPM
- Tempo de extracção: 15 min
- RPM extracção: 250 RPM
- Tempo de desorção da fibra: 5 min
- Temperatura de desorção da fibra: 270 °C
- Programa de temperaturas:

Tabela 10 - Programa de temperaturas.

Rate / °C.min ⁻¹	Temperatura / °C
-	90
0,5	100
50,0	320

Calibração

- É necessário efectuar rectas de calibração para as gamas de concentração de interesse de forma a ser possível a quantificação dos compostos que se pretende analisar. Aconselha-se a realização de curvas sempre que se alterem as condições do GC, ocorram reparações técnicas ou no início de uma nova análise
- Realizou-se rectas de calibração para o d₅-TCA: solução em matriz de vinho 6% (v/v), para a quantificação dos vinhos, e solução de hidroalcoólica 6% (v/v), para a quantificação dos macerados. Foram ainda utilizados padrões de controlo com a mesma matriz e em concentrações adequadas.

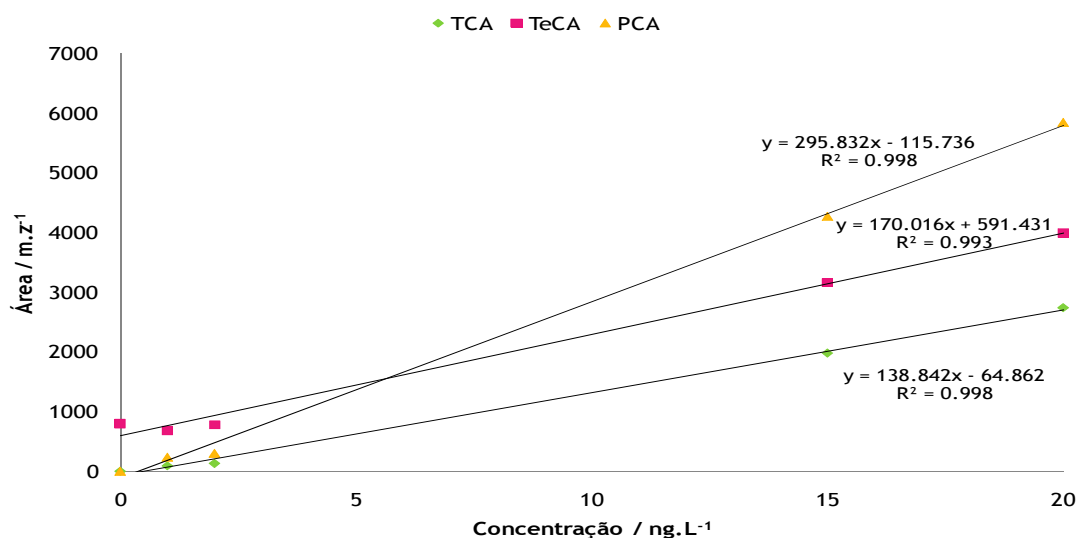


Figura 22 - Curva de calibração para o d₅-TCA, d₃-TeCA e d₃-PCA em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.

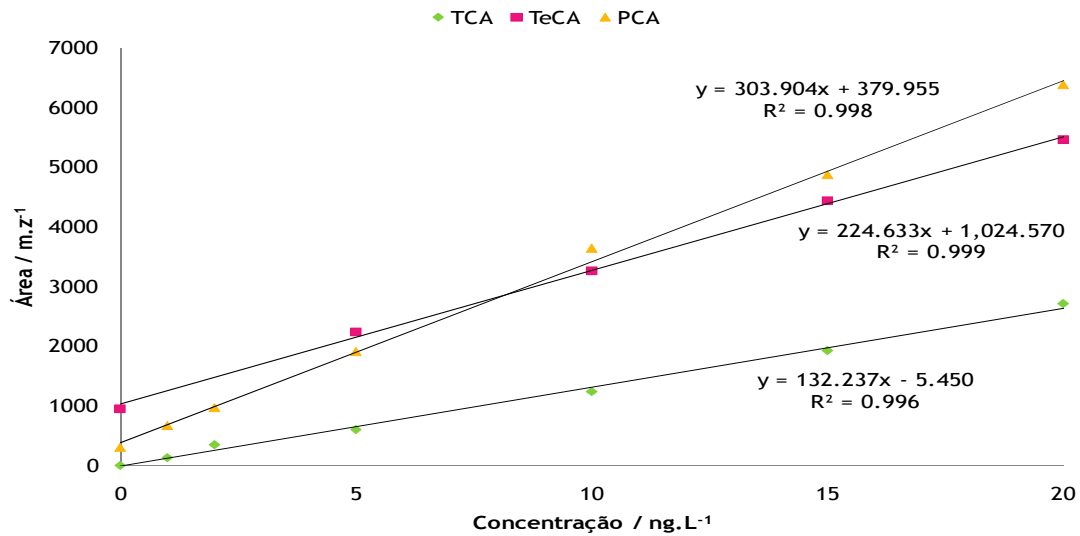


Figura 23 - Curva de calibração do d_5 -TCA, d_3 -TeCA e d_3 -PCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 20 ng.L⁻¹.

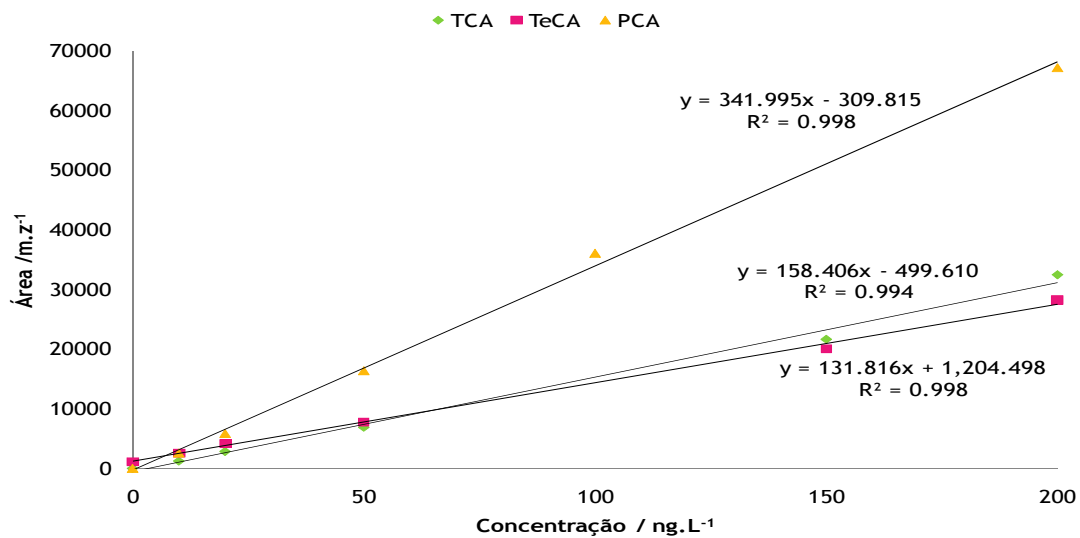


Figura 24 - Curva de calibração do d_5 -TCA, d_3 -TeCA e d_3 -PCA em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.

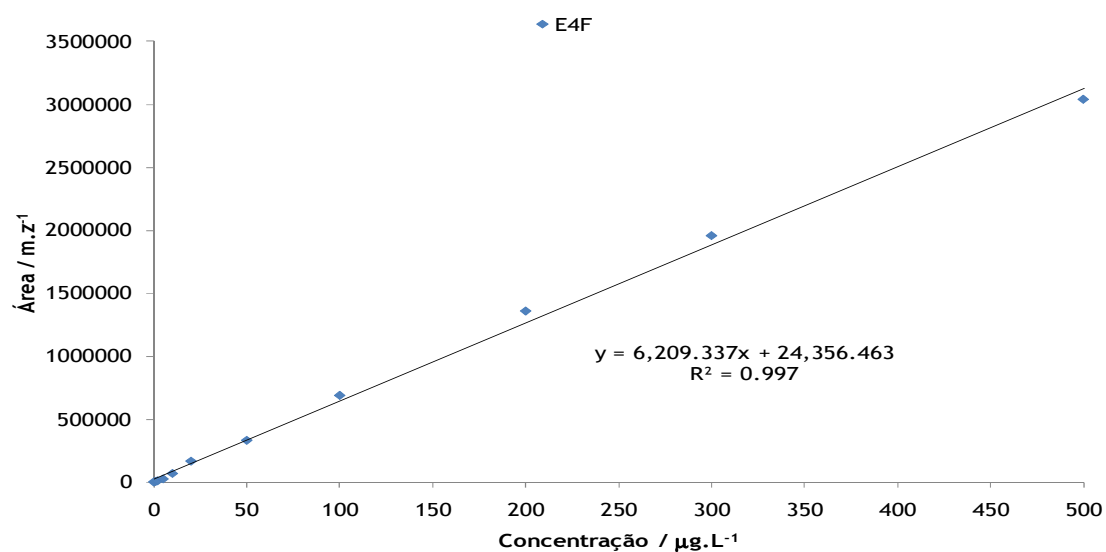


Figura 25 - Curva de calibração do d_4 -E4F em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 500 ng.L⁻¹.

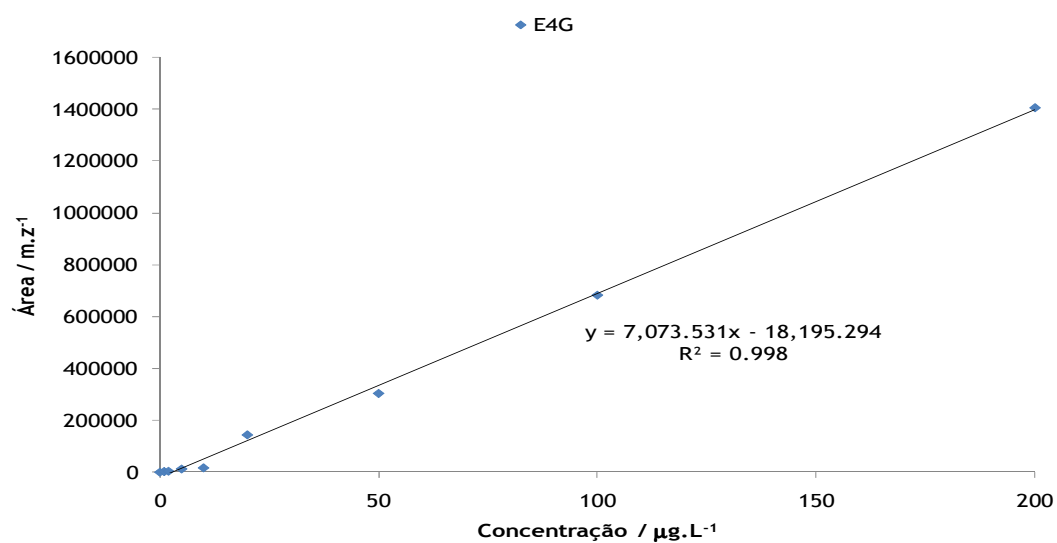


Figura 26 - Curva de calibração do d_4 -E4G em solução hidroalcoólica 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.

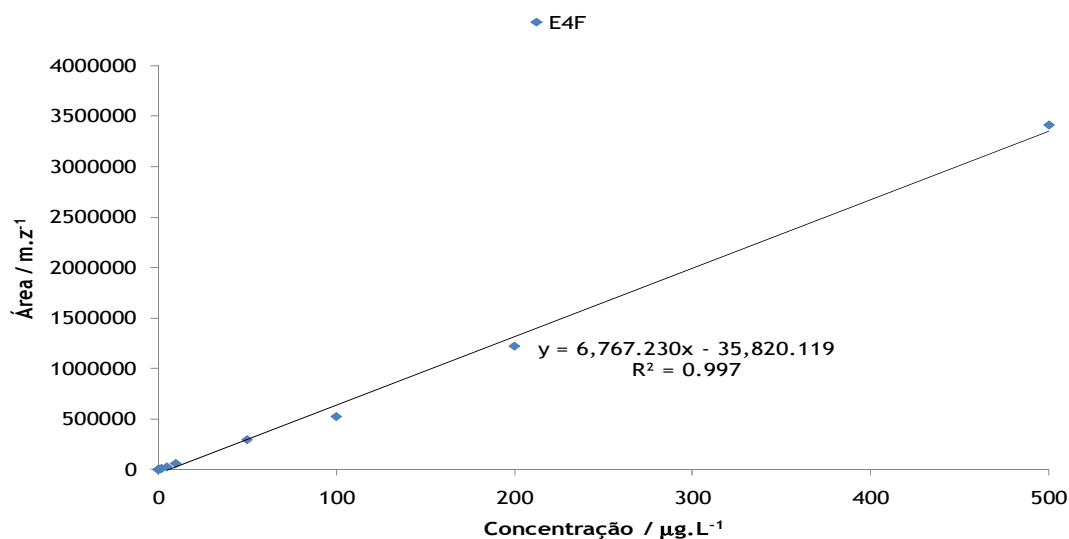


Figura 27 - Curva de calibração do d_4 -E4F em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 500 ng.L⁻¹.

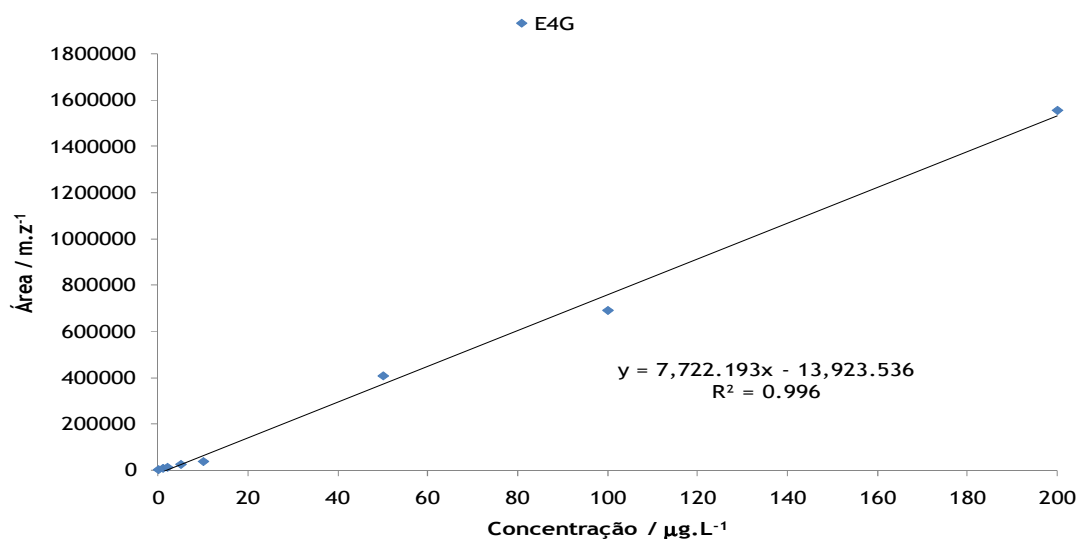


Figura 28 - Curva de calibração do d_4 -E4G em matriz de vinho 6% (v/v), para a gama de concentrações de 0 a 200 ng.L⁻¹.

Tratamento de resultados

- Para quantificar os compostos é necessário integrar os picos correspondentes ao padrão interno e ao contaminante a analisar. Assim obtém-se, para cada amostra, a

área do pico cromatográfico do contaminante (A_{cont}) e a área do pico cromatográfico do respectivo padrão interno ($A_{p.i.}$). Posteriormente, calcula-se o valor médio das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno ($A_{média\ p.i.}$) para se corrigir o valor das áreas dos picos cromatográficos dos contaminantes (A_{cont}^*) com base na equação (1.1).

- Para se obter o valor da concentração do contaminante (C_{cont}), é necessário substituir o valor da área dos picos cromatográficos corrigida (A_{cont}^*) na equação da curva de calibração (1.2 e 1.3).

$$A_{cont}^* = \frac{A_{média\ p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (1.1)$$

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (1.2)$$

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (1.3)$$

Propriedades físico-químicas do vinho

- Encontram-se descritas em Pimenta (2009)

Propriedades físicas das rolhas

- Encontram-se descritas em Pimenta (2009)

Controlo do perfil do gargalo

- Encontra-se descrito em Pimenta (2009)