Hugo Alexandre Dias Ferreira de Oliveira e Silva

Estudo da eliminação de pesticidas ao longo da produção de um vinho

Dissertação para Mestrado em Química



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Química
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
2004

ESTUDO DA ELIMINAÇÃO DE PESTICIDAS AO LONGO DA PRODUÇÃO DE UM VINHO

Aos meus pais

Aos meus avós

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Luís Álvares-Ribeiro, meu orientador, pela disponibilidade demonstrada e pelo apoio.

À Sogrape – Vinhos de Portugal S.A., pela colaboração institucional prestada durante o trabalho, pelo apoio sem o qual seria impossível realizar o projecto e também pela ajuda prestada por muitos dos seus funcionários.

Ao Engenheiro Carlos Azeredo, pelas propostas de trabalho apresentadas, pelas sugestões que foram dadas e pelo interesse que sempre mostrou no avanço do projecto.

Ao Engenheiro João Porto, por toda a aplicação no planeamento do projecto e pela clareza com que sempre expôs a visão da companhia.

Ao Engenheiro Manuel Vieira, pela capacidade de orientar o trabalho que foi preciso realizar e pela disponibilidade que colocou no trabalho.

Ao senhor Joaquim Boavista, por toda a atenção, disponibilidade e amizade que colocou na execução do trabalho de campo, conquistando a minha admiração.

À dona Leopoldina Matos, por toda a ajuda, compreensão e simpatia com que executou o trabalho de vinificação da uvas.

À Nufarm Portugal, Lda., na pessoa do Doutor Jorge Castro, pela gentil cedência de produtos para serem aplicados na vinho.

Aos Dr. António Pereira, Filipe Alves e Joaquim Guedes e ao Eng. Rafael Evangelista, pela ajuda e troca de ideias nos diversos problemas que foram surgindo, que possibilitaram avanços menos penosos no trabalho.

Aos Doutores Clara Basto e Manuel Azenha, pela ajuda que prestaram na discussão de assuntos relativos às técnicas utilizadas e resolução de alguns problemas.

À Doutora Maria Teresa Vasconcelos, pela cedência do aparelho de cromatografia gasosa, sem o qual não teria sido possível realizar todo este trabalho.

Ao Orfeão Universitário do Porto, uma segunda casa, que me proporcionou durante toda a execução do trabalho inúmeros bons momentos, assim como a todos os meus amigos orfeonistas, pelo apoio, incentivo e amizade que sempre me deram.

Ao Professor Maestro Mário Mateus, pelos constantes apelos à precisão e ao método, sem os quais teria perdido uma visão diferente do que é fazer ciência.

Por último, um profundo e sincero agradecimento à Sandra Paiva, pela amizade e boa disposição que sempre proporcionou, pela enorme ajuda que disponibilizou, pela permanente troca de ideias que apontaram diferentes caminhos e pelo simples facto de ter permitido e facilitado toda a execução do trabalho, que tantas vezes se tornou intransponível.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de um método para a determinação de pesticidas em amostras de vinho e o estudo da degradação de vários pesticidas ao longo da produção de um vinho.

O método para a determinação dos pesticidas envolveu cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, sendo os pesticidas extraídos das amostras através da microextracção em fase sólida (SPME).

Foi realizado um estudo sobre os parâmetros mais importantes do sistema de extracção. Foram também testados diferentes programas cromatográficos com vista a detectar um número máximo de pesticidas. Os parâmetros que foram incluídos no desenvolvimento do método foram a temperatura de extracção, tempo de extracção, quantidade de cloreto de sódio e sulfito de sódio adicionadas à amostra.

Os pesticidas foram extraídos das amostras por SPME, utilizando uma fibra com revestimento em Polidimetilsiloxano, com uma espessura de 100 µm. As amostras foram preparadas adicionando 5,00 ml de água a 5,00 ml de amostra, e também 2,00 g de cloreto de sódio. A extracção foi realizada a 60° C, durante 40 minutos, com agitação da amostra através de uma barrinha magnética de 15 mm a 1400 rotações por minuto (RPM). A desadsorção dos analitos foi realizada durante 10 minutos a 250° C.

O método foi caracterizado através da calibração num intervalo de concentrações entre 10 e 200 ppb, para cada pesticida, usando como matriz Vinho Verde branco, assim como também foi avaliada a precisão do método e os seus limites de detecção.

Após o desenvolvimento e caracterização do método analítico, procedeu-se ao estudo da degradação dos pesticidas escolhidos ao longo da vinificação. Os pesticidas estudados foram o Diclofluanida, Dicofol, Fenarimol, Procimidona e Vinclozolina. Foram realizadas aplicações dos pesticidas nas videiras 24 horas antes da vindima. As uvas colhidas foram então submetidas à vinificação de Vinho Verde branco. Foram recolhidas amostras em várias fases do processo, de forma a acompanhar o decaimento dos teores dos diversos pesticidas.

Verificou-se que não foram detectados os pesticidas Dicofol e Fenarimol ao longo de todos os passos da vinificação. Os restantes pesticidas foram seguidos em todas as etapas do procedimento, sendo a determinação feita através da adição de padrão.

A partir dos resultados obtidos foi possível determinar quais os passos preferenciais da degradação de cada pesticida. Foi também possível ajustar o decaimento a leis de cinética, determinando a velocidade específica, k, assim como o tempo de semi-vida.

Abstract

This work aimed at developing a method to determine the presence of pesticides in wine samples, as well as studying the decay of the referred pesticides throughout the vinification process.

The method involved gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), with pesticides being extracted from the samples through solid-phase microextraction (SPME).

The most important parameters of the extraction system were studied and various chromatographic programs have been tested to detect the maximum number of pesticides. The parameters considered for the development of the method were: extraction temperature, extraction time and amount of sodium chloride and sodium sulphite added to the sample.

The pesticides have been extracted from the samples by SPME, using a 100 µm Polydimethylsiloxane-coated fibre. The samples were prepared adding 5,00 ml of water to 5,00 ml of sample and 2,00 g of sodium chloride. The extraction was conducted during 40 minutes, at 60º C, stirring the sample with a 15 mm magnetic bar at 1400 rotations per minute (RPM). In order to ensure the complete desorption of the analytes, the temperature was set to 250º C and the timer to 10 minutes.

In order to characterize the method, white Vinho Verde wine was used as matrix and a concentration range from 10 to 200 ppb was used to calibrate the method for each of the pesticides. Also, the method's precision and detection limits were assessed.

After developing and characterizing the analytical method, the study of the pesticides' decay throughout the vinification process is in order. The pesticides studied were Dichlofluanid, Dicofol, Fenarimol, Procymidone and Vinclozolin. The pesticides were applied to the grapevines 24 hours prior to the crop. The harvested grapes were then vinified according to the Vinho Verde process and several samples were taken from the various stages of the process, so as to bear evidence of the decay of the pesticide concentration.

The Dicofol and Fenarimol pesticides were never detected throughout the vinification process. However, the remaining pesticides were detected

throughout the entire procedure, with its determination being made by standard addition.

From the obtained results, it was possible to determine each pesticide's preferential step of the vinification process to decay more substantially. It was also possible to adjust kinetic laws to the decay, determining the rate constant k, as well as the half-life time.

Índice

AGRADECIMENTOS ..... **V**

RESUMO ..... **VII**

ABSTRACT ..... **IX**

ÍNDICE ..... **XI**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **XV**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **XIX**

PREÂMBULO ..... **XXI**

CAPÍTULO 1 – A VINHA E O VINHO **1**

1.1 INTRODUÇÃO 2

1.2 A VINHA 3

1.2.1 A Videira. Descrição da planta *3*

1.2.2 A casta Loureiro *10*

1.2.3 O ciclo vegetativo *12*

1.2.4 Doenças e parasitas da videira *14*

1.2.4.1 Aranhiço vermelho 15

1.2.4.2 Cigarrinha verde ou Cicadela (Empoasca vitis/Jaccobiasca lybica) 15

1.2.4.3 Míldio da videira (Plasmopara viticola) 17

1.2.4.4 Oídio da videira (forma perfeita: Uncinula necator; forma imperfeita: Oidium tuckeri) 19

1.2.4.5 Podridão cinzenta (Botrytis cinérea) 20

1.3 O VINHO 22

1.3.1 Breve história do vinho *23*

1.3.2 As etapas da produção de um vinho *27*

1.3.3 A vinificação de uvas brancas *43*

1.3.4 As análises de rotina em vinhos e durante a sua produção *53*

1.3.5 A região dos Vinhos Verdes e a Quinta de Azevedo *57*

CAPÍTULO 2 – PESTICIDAS **67**

2.1 – INTRODUÇÃO 68

2.1 – INTRODUÇÃO 68

2.2 - OS PESTICIDAS E O MEIO AGRÍCOLA 69

2.3 O caso do DDT *70*

2.4 - FILOSOFIAS DE APLICAÇÃO DE PESTICIDAS 81

2.5 DEGRADAÇÃO DOS PESTICIDAS 89

2.6 OS PESTICIDAS UTILIZADOS NO ESTUDO 90

CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS ANALÍTICAS **95**

3.1 INTRODUÇÃO 97

3.2 CROMATOGRAFIA 97
3.2.1 Introdução à cromatografia *97*
3.2.2 Definições básicas *99*
3.2.3 Mecanismo e eficiência da separação cromatográfica *100*
3.2.3.1 Número de pratos teóricos 101
3.2.3.2 A equação de Van Deemter 103
3.2.3.3 Implicações dos conceitos teóricos 104
3.2.4 – Exemplos de cromatografia *105*
3.2.5 Equipamentos para Cromatografia Gás-líquido *106*
3.2.6 – Análise dos cromatogramas *111*
3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA 112
3.3.1 Introdução à Espectrometria de massa. O espectro de massa *113*
3.3.2 Métodos usuais de ionização *114*
3.3.3 Instrumentação *115*
3.4 CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA. TÉCNICAS HIFENADAS 116
3.4.1 Introdução às técnicas hifenadas *116*
3.4.2 Interfaces *117*
3.4.3 Computorização e análise de dados *117*
3.5 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA 118
3.5.1 Introdução às técnicas de extracção *119*
3.5.2 Descrição da SPME *122*
3.5.3 Fundamentos da teoria de SPME *125*
3.5.4 Desenvolvimento de um método em SPME *131*
3.5.5 Aplicação da SPME à análise de pesticidas *134*

CAPÍTULO 4 – ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL 137

4.1 - INTRODUÇÃO 139
4.2 – REAGENTES E SOLUÇÕES 139
4.3 – MATERIAL E EQUIPAMENTO 141
4.4 – PROCEDIMENTOS GERAIS PARA O ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL 143
4.5 – OUTROS ASPECTOS EXPERIMENTAIS 144

CAPÍTULO 5 – PROGRAMAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROSCOPIA DE MASSA 147

5.1 INTRODUÇÃO 149
5.2 O PRIMEIRO PROGRAMA GC/MS 149
5.2.1 Parte relativa à Cromatografia Gasosa *149*
5.2.2 Parte relativa à detecção por Espectroscopia de Massa *150*
5.2.4 Parte relativa à interface GC-MS *150*
5.3 DESCRIÇÃO GERAL DOS PROGRAMAS UTILIZADOS 151

CAPÍTULO 6 – IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 163

6.1 INTRODUÇÃO 165
6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS 165
6.3 CARACTERÍSTICAS PRETENDIDAS PARA O MÉTODO ANALÍTICO 167
6.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO 168
6.4.1 O método inicial 169
6.4.2 Ensaios exploratórios e identificação de sinais 169
6.4.3 Avaliação da forma de aquisição de resultados 175
6.4.4 Melhoramento do método analítico 179
6. 5 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 187
6.5.1 Descrição geral do método 187
6.5.2 Caracterização do método 188
6.5.2.1 Avaliação da sensibilidade e calibração 188
6.5.2.2 Precisão do método 192
6.5.2.3 Limites de quantificação 194
6.5.3 Espécies identificadas 195

CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO INICIAL DOS PESTICIDAS EM UVAS 201

7.1 INTRODUÇÃO 203
7.2 A ESCOLHA DOS GRUPOS DE APLICAÇÃO DOS PESTICIDAS 203
7.3 AVALIAÇÃO SOBRE A ESCOLHA DOS PARES DE PESTICIDAS ENTRETANTO EFECTUADA 207
7.4 REORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE PESTICIDAS 212

CAPÍTULO 8 – OS PESTICIDAS DURANTE A PRODUÇÃO DE UM VINHO 217

8.1 INTRODUÇÃO 219
8.2 O PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO 219
8.2.1 Descrição do procedimento de vinificação 219
8.2.2 – Recolha das amostras 225
8.3 RESULTADOS OBTIDOS 227
8.3.1 Determinação das concentrações 228
8.3.2 Fenarimol e Dicofol 230
8.3.3 Diclofluanida 230
8.3.4 Procimidona 235
8.3.5 Vinclozolina 239
8.3.5 Avaliação conjunta dos resultados 243

CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES 251

9.1 CONCLUSÕES 253

BIBLIOGRAFIA 255

Índice de Tabelas

CAPÍTULO 1 – A VINHA E O VINHO 1

TABELA 1.1 – PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO MOSTO E DO VINHO 30
TABELA 1.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS MOSTOS OBTIDOS NUM CICLO DE PRENSAGEM 49

CAPÍTULO 2 – PESTICIDAS 67

TABELA 2.1 – LISTA DE PRODUTOS APLICADOS NOS 5 ANOS ANTERIORES AO ESTUDO 91
TABELA 2.2 – LISTA DE PRODUTOS APLICADOS NO ANO DO ESTUDO 91
TABELA 2.3 – LISTA DOS PRODUTOS ESTUDADOS 92
TABELA 2.4 – DADOS REFERENTES AO DICLOFLUANIDA 92
TABELA 2.5 – DADOS REFERENTES AO DICOFOL 92
TABELA 2.6 – DADOS REFERENTES AO FENARIMOL 93
TABELA 2.7 – DADOS REFERENTES AO IMIDACLOPRIDE 93
TABELA 2.8 – DADOS REFERENTES AO MANCOZEBE 93
TABELA 2.9 – DADOS REFERENTES AO MICLOBUTANIL 93
TABELA 2.10 – DADOS REFERENTES AO PROCIMIDONA 94
TABELA 2.11 – DADOS REFERENTES AO VINCLOZOLINA 94
TABELA 2.12 – LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS PARA OS PESTICIDAS ESTUDADOS, EM UVAS 94

CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS ANALÍTICAS 95

CAPÍTULO 4 – ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL 137

TABELA 4.1 – TEMPOS DE ESTABILIZAÇÃO DA TEMPERATURA PARA A IMERSÃO DE AMOSTRAS NO BANHO DE AQUECIMENTO 146

CAPÍTULO 5 – PROGRAMAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROSCOPIA DE MASSA 147

TABELA 5.1 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA 152
TABELA 5.2 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_1 153
TABELA 5.3 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_2 154
TABELA 5.4 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_3 155
TABELA 5.5 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_4 156
TABELA 5.6 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_4_SHORT 157
TABELA 5.7 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_SCREENING 158
TABELA 5.8 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_SCREEN_HYDRO 159
TABELA 5.9 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_5 160
TABELA 5.10 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_5_SHORT 161
TABELA 5.11 – DESCRIÇÃO DO PROGRAMA PESTICIDA_6 162

CAPÍTULO 6 – IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 163

TABELA 6.1 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O PROGRAMA PESTICIDA 171

TABELA 6.2 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O PROGRAMA PESTICIDA_1 172
TABELA 6.3 – RESULTADOS OBTIDOS PARA OS PROGRAMAS PESTICIDA_2 E PESTICIDA_3 173
TABELA 6.4 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O PROGRAMA PESTICIDA_4 173
TABELA 6.5 – VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRACÇÃO 174
TABELA 6.6 – LISTA DOS FRAGMENTOS M/Z UTILIZADOS NA QUANTIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS. 179
TABELA 6.7 – AVALIAÇÃO DA ÁREA DOS PICOS PARA AS DIFERENTES FIBRAS 180
TABELA 6.8 – RESULTADOS DA VARIAÇÃO INICIAL DE PARÂMETROS 181
TABELA 6.9 – VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRACÇÃO 182
TABELA 6.10 – ESTUDO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E SULFITO DE SÓDIO 183
TABELA 6.11 – ESTUDO DA TEMPERATURA E TEMPO DE EXTRACÇÃO 184
TABELA 6.12 – ESTUDO DA ADIÇÃO DO SULFITO DE SÓDIO 185
TABELA 6.13 – MELHORAMENTO FINAL DO MÉTODO 186
TABELA 6.14 – CALIBRAÇÃO DO MÉTODO 189
TABELA 6.15 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA RESPOSTA DO MÉTODO 191
TABELA 6.16 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO 192
TABELA 6.17 – AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO 193
TABELA 6.18 – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA OS VÁRIOS PESTICIDAS, EM DIFERENTES MATRIZES 195
TABELA 6.19 – LISTA DE PESTICIDAS IDENTIFICÁVEIS PELO MÉTODO PROPOSTO 196
TABELA 6.20 – LISTA DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PELO DO USO DA ESPECTROSCOPIA DE MASSA 198
TABELA 6.21 – LISTA COMPLETA DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO MÉTODO 198

CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO INICIAL DOS PESTICIDAS EM UVAS 201

TABELA 7.1 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS PARA OS PARES E PESTICIDAS APLICADOS DE FORMA INDIVIDUAL 209
TABELA 7.2 – COMPARAÇÃO ENTRE A DEGRADAÇÃO DOS PESTICIDAS NA VIDEIRA E A BAIXA TEMPERATURA 215

CAPÍTULO 8 – OS PESTICIDAS DURANTE A PRODUÇÃO DE UM VINHO 217

TABELA 8.1 – EXEMPLO DE RESULTADOS OBTIDOS EM ENSAIOS DE ADIÇÃO DE PADRÃO 229
TABELA 8.2 – VARIAÇÃO DO TEOR DE DICLOFLUANIDA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 230
TABELA 8.3 – EQUAÇÃO DE CINÉTICA DE 1ª ORDEM PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, CONSTANTE DE VELOCIDADE E TEMPO DE SEMI-VIDA, PARA O DICLOFLUANIDA 234
TABELA 8.4 – VARIAÇÃO DO TEOR DE PROCIMIDONA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 236
TABELA 8.5 – EQUAÇÃO DE CINÉTICA DE 1ª ORDEM PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E TRATAMENTO PELO FRIO, CONSTANTE DE VELOCIDADE E TEMPO DE SEMI-VIDA, PARA O PROCIMIDONA 238
TABELA 8.6 – VARIAÇÃO DO TEOR DE VINCLOZOLINA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 239
TABELA 8.7 – EQUAÇÃO DE CINÉTICA DE 1ª ORDEM PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E TRATAMENTO PELO FRIO, CONSTANTE DE VELOCIDADE E TEMPO DE SEMI-VIDA, PARA O VINCLOZOLINA 242
TABELA 8.8 – PERCENTAGENS DE ELIMINAÇÃO EM CADA FASE DA VINIFICAÇÃO 247

TABELA 8.9 – EQUAÇÕES DE CINÉTICA DE 1ª ORDEM PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 248
TABELA 8.10 – EQUAÇÕES DE CINÉTICA DE 1ª ORDEM PARA O TRATAMENTO PELO FRIO 249
TABELA 8.11 – CONSTANTES DE VELOCIDADE E TEMPOS DE SEMI-VIDA 249

CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES 251

BIBLIOGRAFIA 255

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1 – A VINHA E O VINHO **1**

FIGURA 1.1 – FAMÍLIA DAS VITÁCEAS 4
FIGURA 1.2 – ALGUNS ÓRGÃOS DA VIDEIRA 6
FIGURA 1.3 – ESQUEMA DO BAGO DE UVA 9
FIGURA 1.4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGO DE UVA 9
FIGURA 1.5 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MOSTO 10
FIGURA 1.6 – CACHO DE UVAS DA CASTA LOUREIRO 11
FIGURA 1.7 – CICLO VEGETATIVO ANUAL DA VIDEIRA 14
FIGURA 1.8 – CIGARRINHA VERDE OU CICADELA 16
FIGURA 1.9 – MÍLDIO DA VIDEIRA 17
FIGURA 1.10 – OÍDIO DA VIDEIRA 19
FIGURA 1.11 – PODRIDÃO CINZENTA 21
FIGURA 1.12 – ESMAGADOR EXISTENTE NA QUINTA DE AZEVEDO 29
FIGURA 1.13 – MAPA DA QUINTA DE AZEVEDO 62
FIGURA 1.14 – PRENSA UTILIZADA EM AZEVEDO 64
FIGURA 1.15 – TANQUES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 64

CAPÍTULO 2 – PESTICIDAS **67**

CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS ANALÍTICAS **95**

FIGURA 3.1 – CROMATÓGRAFO GÁS-LÍQUIDO 99
FIGURA 3.2 – CROMATOGRAMA E OS PARÂMETROS MAIS IMPORTANTES 100
FIGURA 3.3 – CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS. 105
FIGURA 3.4 – ESPECTRO DE MASSA DO VINCLOZOLINA 114
FIGURA 3.4 – PERFIS DE EXTRACÇÃO PARA 1 PPM DE BENZENO EM ÁGUA. 129

CAPÍTULO 4 – ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL **137**

CAPÍTULO 5 – PROGRAMAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROSCOPIA DE MASSA **147**

CAPÍTULO 6 – IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO **163**

FIGURA 6.1 – PROGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE MASSA 171
FIGURA 6.2 – SISTEMA DE EXTRACÇÃO TERMOSTATIZADO 174
FIGURA 6.3 – ESPECTRO DE MASSA DO DICLOFLUANIDA 176
FIGURA 6.4 – ESPECTRO DE MASSA DO DICOFOL 177
FIGURA 6.5 – ESPECTRO DE MASSA DO PROCIMIDONA 177
FIGURA 6.6 – ESPECTRO DE MASSA DO VINCLOZOLINA 178
FIGURA 6.7 – ESPECTRO DE MASSA DO FENARIMOL 178
FIGURA 6.8 – GRÁFICO DA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO 190
FIGURA 6.9 – CALIBRAÇÕES INDIVIDUAIS DOS PESTICIDAS 190

CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO INICIAL DOS PESTICIDAS EM UVAS 201

FIGURA 7.1 – MAPA DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DE PESTICIDAS 206

FIGURA 7.2 – MAPA DA SEGUNDA APLICAÇÃO DOS PESTICIDAS 214

CAPÍTULO 8 – OS PESTICIDAS DURANTE A PRODUÇÃO DE UM VINHO 217

FIGURA 8.1 – BALANÇA UTILIZADA PARA A PESAGEM DAS CAIXAS 221

FIGURA 8.2 – ESMAGADOR UTILIZADO PARA A MICROVINIFICAÇÃO 221

FIGURA 8.3 – PRENSA UTILIZADA PARA A MICROVINIFICAÇÃO 222

FIGURA 8.4 – ESMAGAMENTO DAS UVAS E PASSAGEM PARA A PRENSA 222

FIGURA 8.5 – VASILHAMES UTILIZADOS PARA CONSERVAÇÃO DOS MOSTOS 223

FIGURA 8.6 – CONSERVAÇÃO DOS GARRAFÕES DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 224

FIGURA 8.7 – TANQUE ONDE SE CONSERVARAM OS GARRAFÕES 225

FIGURA 8.8 – GRÁFICO DEMONSTRATIVO DA ADIÇÃO DE PADRÃO 229

FIGURA 8.9 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR DE DICLOFLUANIDA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 231

FIGURA 8.10 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR EM DICLOFLUANIDA DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 234

FIGURA 8.11 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR DE PROCIMIDONA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 237

FIGURA 8.12 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR EM PROCIMIDONA DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E TRATAMENTO PELO FRIO 238

FIGURA 8.13 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR DE VINCLOZOLINA AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 241

FIGURA 8.14 – GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO TEOR EM VINCLOZOLINA DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E TRATAMENTO PELO FRIO 243

FIGURA 8.15 – EVOLUÇÃO DOS TEORES DOS PESTICIDAS AO LONGO DA PRODUÇÃO DO VINHO 245

CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES 251

BIBLIOGRAFIA 255

Preâmbulo

Génese do tema e enquadramento do trabalho

Num País com grandes tradições vitivinícolas, existe sempre um grande interesse na investigação dessa área, ainda que Portugal tenha pouca apetência para criar hábitos de investigação junto do sector empresarial. Num contacto com uma empresa do sector, surgiram várias propostas de assuntos que gostariam que fossem estudados. Entre eles, a implementação de um método para a determinação de pesticidas no vinho.

É necessário ter controlo sobre a existência de determinados pesticidas nos vinhos mas não é fácil adquirir equipamento capaz de executar esse tipo de análise, já que os custos de aquisição são elevados, ao que se deve acrescentar os custos de utilização e manutenção. Assim, as amostras de vinho são enviadas para laboratórios estrangeiros para que sejam objecto dessa determinação (em Portugal há poucos que realizem a análise e com custos por vezes incomportáveis).

Surgiu, paralelamente, o interesse de utilizar o método a ser desenvolvido no estudo do comportamento de pesticidas ao longo de toda a produção de um vinho, desde as uvas que chegam à adega até ao produto final. A Sogrape iria colaborar com o estudo, realizando as aplicações dos produtos e as posteriores vinificações das uvas. O trabalho de campo seria feito na Quinta de Azevedo porque, como está na região dos Vinhos Verdes, a maior parte dos pesticidas adequava-se a essas vinhas, sendo que era relativamente próxima para permitir deslocações rápidas e frequentes e porque se poderia contar com mão-de-obra capaz de executar os trabalhos.

O passo seguinte foi decidir os pesticidas a estudar. A Quinta de Azevedo encontra-se no regime da Protecção Integrada, pelo que apenas puderam ser utilizados pesticidas listados para esse efeito.

Depois de planeado o trabalho de campo, seria necessário organizar o trabalho de microvinificação. Decidiu-se que o trabalho seria realizado nas

instalações da empresa em Avintes. Foram também esclarecidas quais as condições que seriam disponibilizadas para o efeito e o procedimento de vinificação a ser utilizado.

O trabalho baseou-se nas seguintes ideias:
Conjugar a investigação com o mundo empresarial;
Explorar técnicas recentes;
Incluir no trabalho o aspecto da Análise Ambiental.

Objectivos gerais do trabalho

Estabelecer um método suficientemente flexível para a determinação de pesticidas durante a vinificação;
Determinar os pesticidas durante a vinificação;
Identificar quais os passos responsáveis pela eliminação dos pesticidas.

Organização da dissertação

Esta dissertação começa com três capítulos de carácter geral. Nestes capítulos abordam-se assuntos relacionados com os temas deste trabalho.

No primeiro capítulo é feita uma incursão sobre os aspectos gerais da viticultura e do vinho. Referem-se o ciclo vegetativo da videira e as doenças mais comuns. Referem-se depois os processos de produção do vinho e, finalmente, as análises mais comuns que são realizadas.

No segundo capítulo é feita uma explicação sobre a utilização de pesticidas de uma forma geral, as filosofias de aplicação desses produtos e, finalmente, algumas das características químicas dos pesticidas em estudo.

O terceiro capítulo refere-se às diferentes técnicas analíticas que foram utilizadas durante este trabalho, nomeadamente, Cromatografia Gasosa, Espectroscopia de Massa e Microextracção em Fase Sólida. São feitas descrições de cada uma das técnicas, tentando no final fazer uma avaliação sobre a sua conjugação.

Em alguns aspectos, as descrições feitas nos capítulos introdutórios são algo extensos mas apenas reflectem o desconhecimento sobre certas matérias, as quais se julgou importante que ficasse registado.

Seguem-se três capítulos sobre a implementação do trabalho experimental. No quarto capítulo é apresentada uma descrição sobre os aspectos gerais da parte experimental do trabalho, focando o material utilizado e os procedimentos laboratoriais utilizados.

O quinto capítulo é dedicado à descrição dos programas de cromatografia que foram escritos e utilizados durante a fase inicial do trabalho, fazendo a avaliação de cada um deles.

O sexto capítulo refere-se aos vários passos dados na implementação do método analítico. São referidos os vários métodos utilizados no tratamento das amostras e os métodos de extracção. Descreve-se o estudo dos parâmetros mais importantes do método. Finalmente, é realizada a caracterização geral dos parâmetros analíticos mais importantes do método.

Nos capítulos seguintes apresentam-se os resultados obtidos no trabalho. O sétimo capítulo é dedicado à explicação da organização inicial do trabalho e da avaliação das escolhas dos grupos de pesticidas.

No oitavo capítulo descrevem-se os resultados obtidos durante a produção de um vinho. É feita uma avaliação sobre os passos mais importantes para o desaparecimento dos pesticidas e tenta-se adaptar os resultados obtidos a leis de cinética.

Finalmente, o nono capítulo é dedicado às conclusões finais, servindo para efectuar um balanço global do trabalho desenvolvido, assim como propostas para futuros trabalhos, dando seguimento ao trabalho efectuado.

Capítulo 1 – A Vinha e o Vinho

Índice do capítulo

CAPÍTULO 1 – A VINHA E O VINHO 1

1.1 INTRODUÇÃO 2

1.2 A VINHA 3

1.2.1 A Videira. Descrição da planta 3

1.2.2 A casta Loureiro 10

1.2.3 O ciclo vegetativo 12

1.2.4 Doenças e parasitas da videira 14

1.2.4.1 Aranhiço vermelho 15

1.2.4.2 Cigarrinha verde ou Cicadela (Empoasca vitis/Jaccobiasca lybica) 15

1.2.4.3 Míldio da videira (Plasmopara viticola) 17

1.2.4.4 Oídio da videira (forma perfeita: Uncinula necator; forma imperfeita: Oidium tuckeri) 19

1.2.4.5 Podridão cinzenta (Botrytis cinérea) 20

1.3 O VINHO 22

1.3.1 Breve história do vinho 23

1.3.2 As etapas da produção de um vinho 27

1.3.3 A vinificação de uvas brancas 43

1.3.4 As análises de rotina em vinhos e durante a sua produção 53

1.3.5 A região dos Vinhos Verdes e a Quinta de Azevedo 57

1.1 Introdução

Neste capítulo descrevem-se aspectos relacionados com a vinha e o vinho.

Inicialmente, faz-se uma menção à vinha, descrevem-se as características da planta, o seu ciclo vegetativo anual, referindo as doenças mais conhecidas. A descrição é por vezes demasiado técnica mas visa dar conhecimento adequado e correcto dos dados. Posteriormente é feita uma breve descrição da história do vinho, da produção de um vinho, particularmente um vinho branco, enumera-se os diversos tipos de análises habituais e, finalmente, é feita uma descrição da região dos Vinhos Verdes e da Quinta de Azevedo.

1.2 A Vinha

A videira é uma planta cultivada em regiões preferencialmente temperadas. Apesar de ter sido alvo de pragas que provocaram o desaparecimento de elevadas áreas de vinha, a videira continua a ser cultivada por todo o mundo com clima adequado e permanece como uma das culturas mais populares no mundo ocidental.

1.2.1 A Videira. Descrição da planta [1,2]

A videira pertence à família das Vitáceas, que engloba cerca de um milhar de espécies que se encontram espalhadas pelo globo. As plantas desta família caracterizam-se por serem trepadeiras e arbustos de haste herbácea, por vezes de caule tuberoso, possuindo cirros opostos às folhas. Esta família compreende 14 géneros, sendo o mais conhecido, o género Vitis, originário das zonas temperadas do hemisfério norte (América, Europa e Ásia). O género Vitis está dividido em dois sub-géneros: Euvitis e Muscadinia. O sub-género Muscadinia compreende 3 espécies, que se encontram no México e Estados Unidos da América. Dentro dessas espécies, a Vitis Rotundifolia é cultivada pois serve para a produção de uvas frescas, doces e vinho, sendo também

importante devido ao facto de ser resistente a algumas doenças, especialmente à Filoxera.

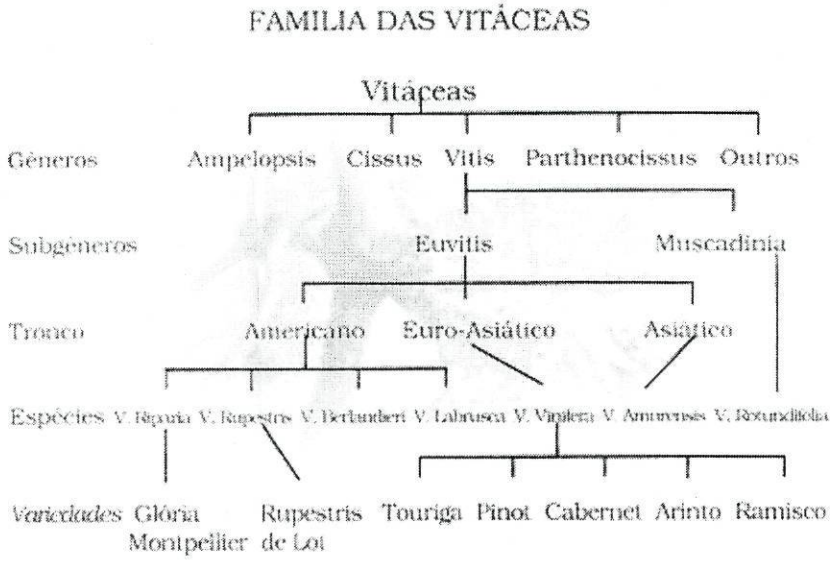


Figura 1.1 – Família das Vitáceas [2]

A vinha cultivada na Europa e noutros continentes produtores de vinho de alta qualidade é a espécie vitis vinifera enxertada em cavalos "troncos" americanos. Assim, a planta cuja raiz está no solo é de uma variedade americana, enquanto é nela enxertada outra planta, que produzirá as uvas.

A Casta é a variedade de videira.

Os principais órgãos que constituem a videira são:

- Raiz
- Tronco ou cepa
- Varas
- Folhas
- Flores
- Frutos

Raiz é a parte subterrânea da videira. As raízes não são todas iguais, havendo, no conjunto, umas grossas e lenhosas mais profundas, que têm a função de segurar a videira à terra, e outras mais finas e tenras, que vivem

mais à superfície, com a função de tirar do terreno os alimentos, e transportá-los até ao tronco ou cepa.

Cepa ou tronco é a parte que vai desde a raiz até às primeiras ramificações, os braços. É dos braços que saem as varas.

O tronco da videira é pouco robusto porque esta é uma trepadeira, que para se manter deve ser suportado por tutores vivos ou mortos.

Dos braços saem as varas que darão o fruto.

Constituição interna do tronco:

- Medula, parte mole que ocupa o centro destes órgãos.

- Cerne é a parte mais escura que se segue à medula. Só se encontra nas cepas e nos braços mais grossos. É constituído por tecidos já mortos, tendo por função suportar o peso dos órgãos que estão por cima.

- Borne é constituído por canais lenhosos por onde sobe a seiva bruta.

- Câmbio é a camada delgada que produz centripetamente as camadas de borne referidas e centrifugamente novas camadas do tecido, a seguir considerado o líber. É esta a camada que se deve pôr em contacto nas enxertias, devendo ligar-se a do garfo com a do cavalo (porta-enxerto).

- Líber, composto por vasos liberinos, sendo por estes vasos que desce a seiva elaborada.

- Casca, camada mais externa, servindo para proteger o conjunto descrito.

- Sarmentos ou varas, nascem de gomos existentes em órgãos idênticos que ficam do ano anterior. Há varas que nascem de gomos normais e outras nascem dos chamados gomos ladrões. Só nos interessam os primeiros, por serem os que frutificam normalmente.

- As folhas: da videira são constituídas por duas partes: pecíolo, a parte mais delgada e o limbo, aparte mais larga e verde. A folha é atravessada por nervuras por onde se faz a circulação da seiva neste órgão.

- As gavinhas: são filamentos espiralados, simples ou ramificados, que servem para a videira, que é uma planta trepadeira, se agarrar aos seus tutores.

- Flores e frutos: as flores da videira são pequenas, tendo dois invólucros protectores: o cálice (androceu) e a corola (gineceu), dentro dos quais estão os órgãos reprodutores, os estames que produzem o pólen, e o pistilo que, depois de fecundado dá o bago e as graínhas.

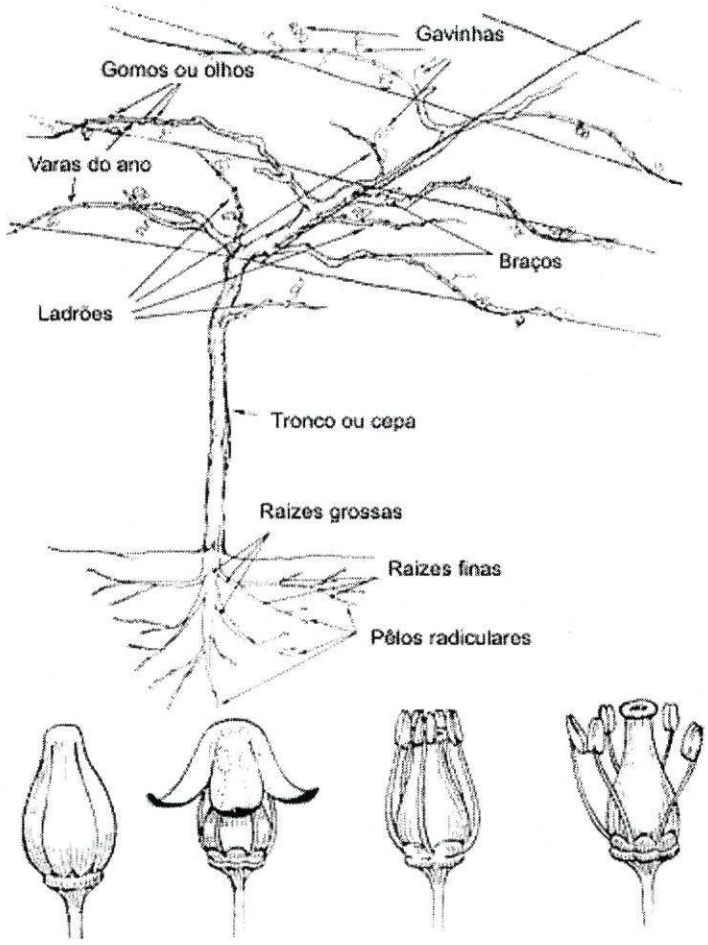


Figura 1.2 – Alguns órgãos da videira [2]

Como vive a videira: as videiras são seres vivos que, para viverem, necessitam de se alimentar. Os alimentos entram, dissolvidos em água, para a videira por uns órgãos chamados pêlos radiculares. Uma vez esses alimentos dentro da raiz, constituem o que se denomina seiva bruta. Esta seiva bruta sobe pelos vasos lenhosos e vai até às folhas. Esses vasos são para a videira o que as veias são para nós. Uma vez chegada à folha, a seiva bruta é transformada em seiva elaborada.

A diferença entre a seiva bruta e a seiva elaborada é que aquela não pode ser aproveitada pelos órgãos da videira sem sofrer transformações que a tornem aproveitável. Depois destas transformações que a tornam assimilável,

origina-se a seiva elaborada. As transformações da seiva bruta em seiva elaborada são devidas a algumas actividades da folha.

Assim, em primeiro lugar, a seiva quando chega à folha vem com muita água, sendo necessário apurá-la, concentrá-la, fazendo evaporar o excesso de água. A água que vem a mais é deitada para fora por uns orifícios existentes, chamados estomas. A essa função da folha chama-se transpiração. A folha tem uma substância verde, denominada clorofila, com a capacidade de absorver o dióxido de carbono do ar que, pela acção da luz, forma substâncias parecidas com o açúcar.

A clorofila só se forma quando a videira ou qualquer outra planta recebe luz. A sua quantidade é, dentro de certos limites, tanto maior quanto maior for a iluminação da folha. Daqui se deduz a importância da exposição a dar à videira para que esta receba o máximo de luz.

Além das funções já consideradas, a folha tem ainda outra, a respiração. Nesta função absorve oxigénio do ar e deita fora anidrido carbónico. É, de certo modo, uma função inversa da assimilação do carbono.

A respiração dá-se sempre, enquanto que a assimilação do carbono só se dá de dia, pois é necessária a presença de luz solar. Daqui se deduz a grande importância que as folhas têm para a videira, servindo tanto as raízes para a alimentação, pois se as segundas absorvem alimentos as primeiras põem-nos aptos a serem aproveitados.

Será feita agora uma pequena descrição dos frutos da videira.

A película é a parte externa do bago, trazendo para os mostos as leveduras, matéria corante, substâncias aromáticas, tanino, ácidos orgânicos, etc. É exteriormente recoberta por uma substância cerosa e pulverulenta, denominada pruína. É sobre ela que se fixam as leveduras e as bactérias. A levedura é um ser microscópico que segrega uma enzima ou diástase que decompõe o açúcar da uva (glucose e levulose) produzindo, principalmente: álcool etílico, dióxido de carbono, ácido succínico e glicerina, e ainda ácidos voláteis, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, alcalóides, etc.

Há diversas variedades de leveduras. As principais que operam a fermentação dos mostos são as seguintes:

- Saccharomyces Ellipsoideus (Cerevisiae)
- Saccharomyces Pasteurianus

- Kloeckera Apículata
- Saccharomyces Oviformis
- Saccharomyces Chevalieri
- Saccharomyces Ludwigii

As leveduras podem reproduzir-se por duas formas:

1 - Gemação de novas células. É a sua forma de reprodução nos mostos em fermentação, processo este que consiste na formação de pequenas protuberâncias na superfície da célula que, depois de se desenvolverem, se desprendem, passando a ter vida independente.

2 - Esporulação de novas células. Consiste na formação no interior das células dos órgãos reprodutores, denominados esporos, que se tornam livres pela ruptura das células.

A polpa, que representa cerca de 84% do total do bago, é por excelência a parte rica da uva. Pelo esmagamento das uvas, com a ruptura da película, esfacelamento da polpa, resulta o mosto rico em açúcar (glucose e levulose) e ácidos (málico, tartárico, cítrico. etc.) nele existindo ainda variados elementos em menor quantidade, mas cuja presença tem acção importante, já na produção ou na conservação e qualidade do futuro vinho.

As graínhas, como sementes, são os órgãos reprodutores da videira. Encontram-se ao centro do bago, sendo ricas em tanino e óleo. O primeiro, de alto valor para a limpidez e conservação do vinho. Quanto ao óleo, não tem qualquer vantagem enotecnológica; pelo contrário, devemos evitar a sua libertação, que daria mau sabor ou um defeito de manifestação organoléptica idêntica à doença da gordura.

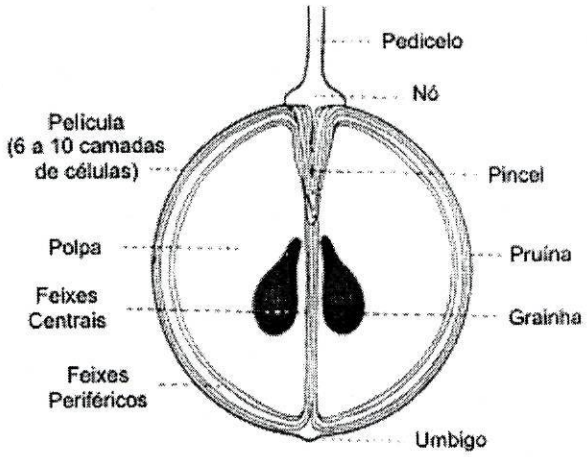


Figura 1.3 – Esquema do bago de uva [2]

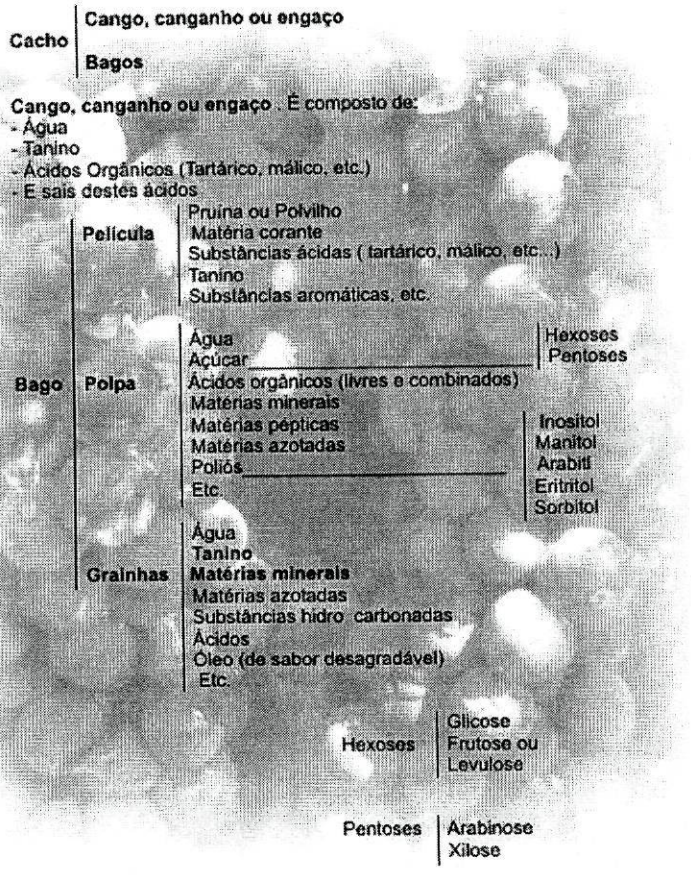


Figura 1.4 – Composição química do bago de uva [2]

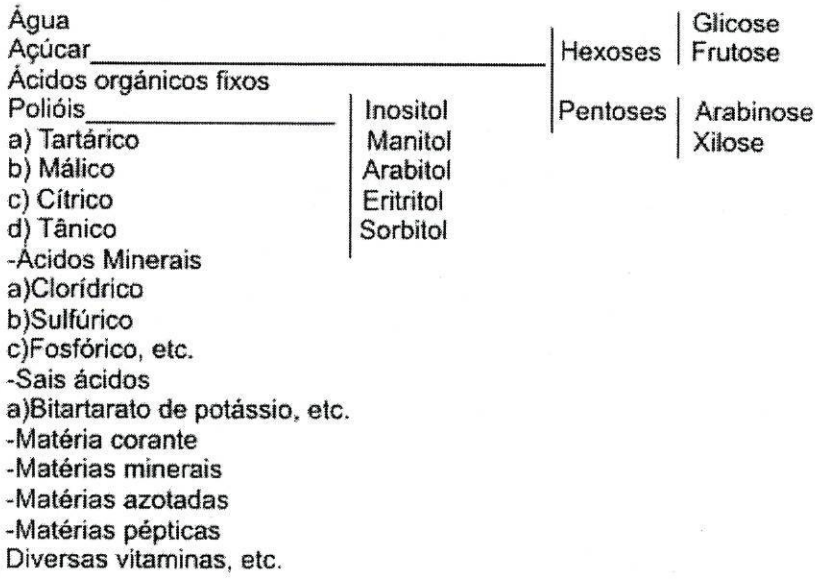


Figura 1.5 – Composição química do mosto [2]

1.2.2 A casta Loureiro [3]

Esta casta branca é de alta qualidade, recomendada em grande parte da Região Demarcada dos Vinhos Verdes, com excepção das Sub-Regiões de Basto e Amarante e concelhos de Baião, Cinfães e Resende; de área de cultivo em grande expansão, é oriunda da Ribeira-Lima; muito produtiva; dá origem a vinhos com aroma acentuado à casta, harmoniosos e saborosos.

Sinonímia: conhecida por «Loureira» ou «Branco Redondo» no concelho da Póvoa de Varzim, por «Dourado(a)» em Viana do Castelo, por «Marquês» nos concelhos de Paços de Ferreira, Santo Tirso e Caminha, e por «Arinto» no sul da Região; é ainda conhecido por «Moscatel» e trata-se provavelmente da «Loureira» da Província Espanhola da Galiza.

Outras características:

Abrolhamento: aberto, muito cotanilhoso, branco e com orla carminada.

Folha jovem: verde com manchas bronze, às vezes amarela acobreada; muito bolhosa; muito cotanilhosa na página inferior.

Flor: hermafrodita.

Pâmpanos: entre-nós verdes e nós com estrias vermelhas pela face dorsal, e verdes pela face ventral; gomos verdes; porte meio-erecto a horizontal.
Gavinhas: descontínuas, compridas e tearâneas; muito divididas, vigorosas e enroscadas.

Folha adulta: tamanho médio, pentagonal, quinquelobada, às vezes acentuadamente trilobada, cor verde médio, perfil irregular com elevação dos lobos normalmente revolutos, medianamente bolhosa e às vezes com enrugamento; dentes curtos e médios, de lados convexos; seio peciolar pouco aberto com base em V, e seios laterais superiores fechados com base em U; ponto peciolar e início das nervuras principais carminados, em ambas as páginas; cotanilhosa e fracamente cerdosa na página inferior; pecíolo penugento.

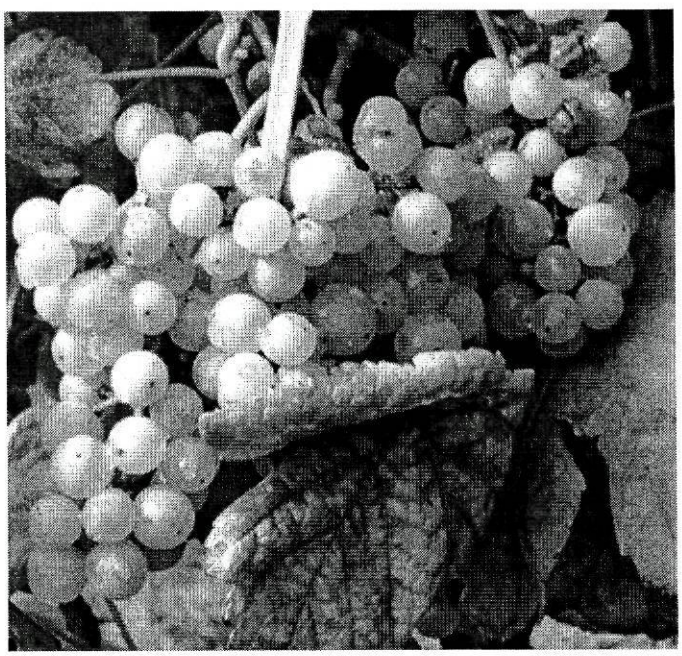


Figura 1.6 – Cacho de uvas da casta Loureiro

Cacho: grande, às vezes médio; cilindro-cónico; compacidade média; pedúnculo de comprimento médio e lenhificação média (Figura 1.6).

Bago: tamanho médio e uniforme; arredondado, às vezes ligeiramente achatado; cor verde amarelada; com pruína, película de espessura média e hilo

pouco aparente; polpa mole, suculenta e de sabor especial; pedicelo de comprimento médio e fácil separação.

Graínhas: de tegumento pouco duro, predominam em número de uma por bago; tamanho médio, bojudas, de bico curto pouco pronunciado.

Sarmentos: de secção transversal elíptica, superfície estriada e costada, e cor castanha amarelada; extensos e vigorosos; entre-nós de comprimento médio e nós relativamente volumosos; gomos de tamanho médio, em cúpula e salientes.

1.2.3 O ciclo vegetativo [1,2]

A descrição do ciclo vegetativo da videira permite elucidar sobre a razão da aplicação de certos produtos químicos em certas alturas e o surgimento de certas pragas.

O ciclo vegetativo inicia-se na Primavera, quando a temperatura do ar atinge cerca de 12º C e vai até à queda das folhas, que depende das condições meteorológicas, da temperatura, humidade, chuvas, etc. Entre a queda das folhas (em meados de Novembro) e o início do ciclo vegetativo, a videira encontra-se em repouso vegetativo. De Março a Agosto, a videira encontra-se em crescimento. Depois, e até Novembro (altura em que as folhas voltam a cair), ocorre a formação de reservas de nutrientes na planta, para preparar um novo período de dormência.

Em Fevereiro, todas as espécies de folha caduca estão em fase de dormência, pois a temperatura não favorece ainda a actividade vegetativa aérea, que só começa no mês de Março, altura em que se dá o abrolhamento (designação para o lançamento de gomos ou rebentos).

O anúncio do começo da actividade vegetativa é o aparecimento de um líquido, a seiva bruta, a que se dá o nome de choro, e cujo aparecimento está directamente ligado à temperatura do solo. Quando se atingem os 12º a 15º C., começa a verificar-se a actividade no sistema radicular e, 3 a 5 semanas depois do aparecimento do choro, dá-se então o abrolhamento. Inicia-se com o aparecimento de pontas verdes, seguido da saída das folhas, que depois se soltam. Posteriormente ficam visíveis os cachos, que se irão futuramente separar.

Em meados de Abril deve aparecer a primeira inflorescência, com a formação de botões florais separados, sendo que a floração deverá ocorrer já em Maio.

Após esta fase, começam a formar-se os futuros bagos, a que se dá o nome de alimpa. Com o crescimento dos bagos, passamos pelas fases do Bago Chumbo e do Bago Ervilha. Depois ocorre o fecho dos cachos, com os bagos a crescerem bastante formando um cacho completo mas de uvas ainda verdes. O amadurecimento dos bagos vai se tornando uma realidade com a passagem ao estado de Pintor, em que as uvas já apresentam a sua coloração quase definitiva, e que deverá ocorrer no início de Julho. No final deste mesmo mês, deverá iniciar o atempamento, em que se diz que as varas da vinha vingam e desenvolvem. A partir desta fase, o grau de amadurecimento das uvas é controlado pelo produtor. Cabe a ele decidir em que altura deve colher os cachos, sabendo que o final do crescimento/amadurecimento dos frutos deverá ocorrer no final de Agosto até meados de Setembro, conforme as regiões e as condições climatéricas.

A Figura 1.7 mostra todo o ciclo vegetativo da videira.

Para que as diferentes fases do desenvolvimento da videira decorram da melhor maneira, é indispensável a presença constante do viticultor, porque ao longo de todo o ano a vinha exige um cuidado muito atento: é necessário amanhar, proceder à segunda lavra das terras, mondar, cercear, desfolhar, chegar a terra ao pé das plantas e outros cuidados vitivinícolas que lhe devem ser dedicados. O viticultor de qualquer região deve ser paciente e obstinado.

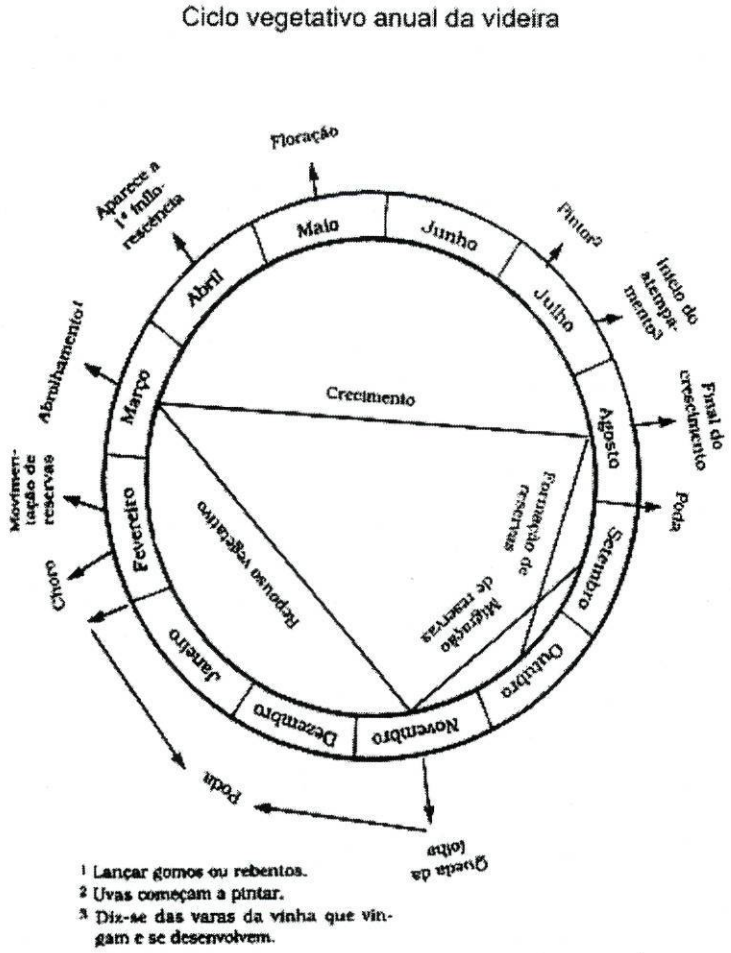


Figura 1.7 – Ciclo vegetativo anual da videira

1.2.4 Doenças e parasitas da videira [1,4]

Nesta secção é feita uma breve descrição de algumas doenças e parasitas mais comuns da videira e que podem ser tratadas com a aplicação dos pesticidas que são objecto de estudo neste trabalho. No entanto, é importante referir que o combate de parte das doenças e parasitas que atacam a videira pode ser efectuado pela introdução de certas espécies auxiliares, que são predadores naturais, nomeadamente dos parasitas animais.

1.2.4.1 Aranhiço vermelho

São na realidade minúsculos acarídeos parasitas da vinha que provocam importantes estragos.

Os ovos deste parasita, de cor vermelha viva, passam o Inverno reunidos em placas em cima da casca ao nível dos nós dos sarmentos e nas fendas das cascas. Na Primavera eles abrem desde o abrolhamento e deles saem larvas que atacam os rebentos novos e que sofrem várias transformações em 5 a 20 dias, para chegarem ao estado adulto. Larvas e seres adultos atacam o limbo das folhas para se alimentarem com o suco celular; o desenvolvimento da vegetação é travado, os merítalos permanecem curtos e por vezes dá-se o desavinho. No fim do Verão, os estragos podem tornar-se importantes se o tempo estiver seco e quente. A folhagem fica com um aspecto geral cinzento-plúmbeo. Os acarídeos, visíveis na face inferior, picam as folhas. Eles prejudicam a fotossíntese, activam a respiração e causam um murchar prematuro da folhagem, uma má maturação e um atempamento incompleto.

Para actuar contra este tipo de praga deve-se utilizar meios profiláticos e também meios de luta directa, se os primeiros não resultarem. Do ponto de vista profilático, a luta contra outras pragas, como a Cochylis, a Eudemis ou o míldio, deve ser efectuadas com produtos que não favoreçam o aparecimento do aranhiço vermelho. Se, por ventura, for necessário a intervenção química para o combate directo, pode ser feita de um ponto de vista sistemático, fazendo tratamentos com ésteres fosfóricos ou acaricidas específicos, como o Dicofol. Se o combate directo for feito racionalmente, tratar no Verão, antes do depósito das posturas de Inverno, a fim de destruir a maioria dos ovos, o que limitará os ataques precoces da Primavera. Para esse efeito, pode ser usado o mesmo produto sugerido acima.

1.2.4.2 Cigarrinha verde ou Cicadela (Empoasca vitis/Jaccobiasca lybica)

As picaduras que causam na página inferior das folhas liberta uma saliva tóxica para o seu interior interrompendo a circulação da seiva (Figura 1.8).

As folhas enrolam para a página inferior, tomam uma cor amarelada nas castas brancas e avermelhada nas castas tintas, ficando apenas verdes as

nervuras. As zonas cloróticas acabam por necrosar, dando no final do seu ciclo a sensação das videiras terem sido queimadas.

Os seus danos causam quebras de produção, mau atempamento das varas e um enfraquecimento progressivo das cepas. Os sintomas causados por esta praga podem ser confundidos com os da esca.

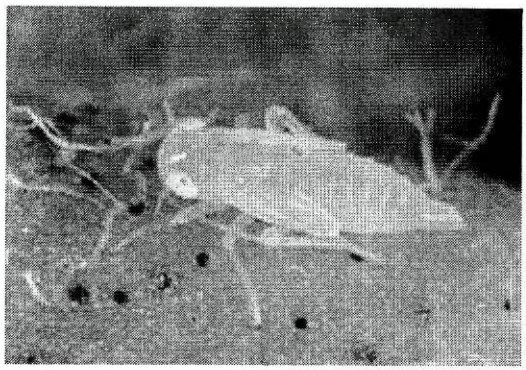


Figura 1.8 – Cigarrinha Verde ou Cicadela [4]

Estes insectos hibernam no estado adulto em plantas arbóreas, arbustivas ou arvenses: Na Primavera migram para a videira onde completam 3 a 4 gerações.

As larvas da 1ª geração, de cor verde, surgem no início do Verão. Os adultos fazem as posturas entre as nervuras e no pecíolo das folhas, vivendo o insecto preferencialmente na página inferior.

O recurso a armadilhas para captura de adultos e a contagem do nº de larvas presentes na página inferior das folhas desde o final da Primavera permitem quantificar as populações e, de acordo com os níveis económicos de ataque estabelecidos determinar as épocas de intervenção com insecticidas homologados.

Esta praga era, até aos anos 80, ocasional nalgumas vinhas do Sul do país.

Contudo, nos últimos anos tem-se expandido a outras regiões vitícolas com grande incidência.

1.2.4.3 Míldio da videira (Plasmopara viticola)

Ataca todos os órgãos verdes da videira.

A doença manifesta-se nas folhas pelo aparecimento de manchas translúcidas e oleosas na página superior e de um enfeltrado de micélio branco nas zonas coincidentes com essas manchas, na página inferior. Em castas tintas as folhas tomam uma coloração avermelhada. À medida que a doença avança, as folhas acabam por necrosar (Figura 1.9).

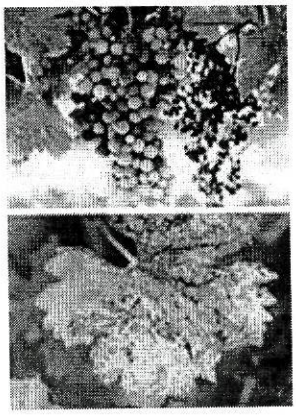


Figura 1.9 – Míldio da Videira [4]

Durante a floração pode ocorrer a destruição das inflorescências. Nos cachos, os bagos e o ráquis evidenciam também a presença de micélio e de frutificações de cor branca, evoluindo para castanho e acabando por engelhar, secar e quebrar ao mínimo contacto.

Nos pâmpanos e sarmentos os ataques ocorrem precocemente e até antes do atempamento. Os tecidos afectados tomam uma coloração castanha, os pâmpanos curvam-se em forma de "S" e ficam cobertos de um enfeltrado de micélio banco.

A queda das folhas afecta o teor de açúcar das uvas e o atempamento das varas e a vitalidade das cepas.

Os principais prejuízos resultam do ataque do fungo às inflorescências e aos bagos.

É um endoparasita inevitável e específico da videira. No Outono as folhas apresentam pequenas manchas com aspecto de mosaico (míldio em mosaico).

No interior das folhas surgem hifas (anterídio e oogónio) cuja função é dar origem aos oósporos frutificações sexuadas que permitem a hibernação do fungo.

Na Primavera, quando ocorrem precipitações com um mínimo de 10 mm e uma temperatura de 10°C, os oósporos germinam e produzem macroconídios ou zoosporângios. Estes, em presença de água, libertam zoósporos (esporos com cílios ou flagelos) que lhes confere mobilidade na água. Ao atingirem a página inferior das folhas e em presença de água os zoósporos emitem um tubo germinativo que penetra no interior das folhas através dos estomas.

Em função das condições climáticas a doença tem um tempo de incubação mais ou menos longo após o qual surgem manchas de aspecto oleoso.

Se o tempo decorrer chuvoso, com temperaturas de 15-21°C e humidade relativa elevada, na página inferior surgem as frutificações do fungo que serão responsáveis pelas infecções secundárias. Estas sucedem-se sempre que as condições climáticas sejam favoráveis à doença. Temperaturas acima de 30°C começam a ser prejudiciais ao fungo. O ciclo do míldio completa-se no Outono com a formação dos oósporos (ou ovos de Inverno).

Quando existem focos de infecção primários importantes e condições climáticas favoráveis, considera-se o míldio da videira uma doença de risco elevado.

Como medidas profiláticas recomenda-se a eliminação dos ramos ladrões e uma boa drenagem das vinhas para evitar zonas de encharcamento.

Por outro lado é importante a identificação dos focos primários desta doença (geralmente nas zonas mais baixas e húmidas) quando as condições forem favoráveis ao seu desenvolvimento (pâmpanos com mais de 10 cm, chuva, mínimo 10 mm de precipitação, humidade elevada e temperaturas de cerca de 10°C).

Podem desenvolver-se diferentes estratégias de tratamento:

A partir da identificação dos focos primários: realizar tratamentos preventivos com fungicidas anti-míldio. Sempre que possível, devem-se evitar aplicações curativas/erradicativas, a menos que ocorram erros ou uma impossibilidade prática. Naqueles tratamentos deve atender-se ao intervalo entre aplicações, ao tipo de fungicida empregue (riscos de resistência) e à tecnologia da aplicação.

A partir de modelos de previsão da doença: são modelos matemáticos validados regionalmente na prática e a partir dos quais é possível basear uma estratégia de protecção da vinha. De entre estes modelos destaca-se o EPI (Estado Potencial de Infecção) que dá uma ideia da gravidade da doença em caso de chuvas de contaminação.

O míldio é uma doença originária da América, e que é causado pelo fungo *Plasmopara vitícola*, sendo há um século uma das principais doenças da vinha.

1.2.4.4 Oídio da videira (forma perfeita: Uncinula necator; forma imperfeita: Oidium tuckeri)

A videira é susceptível a esta doença desde o abrolhamento até ao fecho dos cachos/pintor. Pode atacar folhas, cachos e sarmentos (Figura 1.10). Manifesta-se inicialmente pela presença de um micélio pulverulento e espesso de cor branca a amarelada sobre os órgãos verdes da videira. As folhas atacadas apresentam um aspecto crispado e dobram-se em goteira. Se se remover o micélio nota-se um rendilhado castanho, que evidencia a presença de haustórios (ramificação de micélio no interior dos órgãos verdes, para alimentação do fungo).

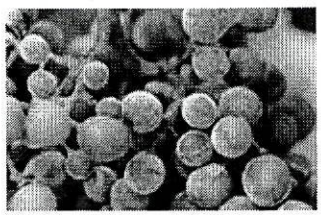


Figura 1.10 – Oídio da videira [4]

Nos cachos, os ataques são mais severos: ficam cobertos por micélio espesso no qual se formam as cleistotecas visíveis a olho nu e os bagos podem fendilhar e/ou suberizar. Na altura da poda as varas apresentam uma cor branca com manchas castanhas típicas.

No final do ciclo da videira é possível notar a presença de cleistotecas nas folhas, cachos e varas.

O oídio passa o Inverno sob a forma de micélio no interior dos gomos ou sob a forma de cleistotecas formadas nas folhas e varas que ficam no solo ou entre a casca (ritidoma) das cepas.

Na Primavera o micélio nos gomos germina, liberta conídios e as cleistotecas rebentam libertando os ascos com os ascósporos. Os conídios e os ascósporos são disseminados pelo vento, até aos órgãos receptivos da videira.

As infecções primárias sucedem-se desde o abrolhamento da videira e com gravidade diferente em função dos factores climáticos e da sensibilidade das castas. Porém, ainda se desconhece a importância das cleistotecas no ciclo do oídio nas nossas condições.

São favoráveis ao desenvolvimento da doença dias nublados com manhãs de elevada humidade relativa do ar (superior a 25%), seguidos de períodos de sol aberto e com temperaturas acima dos 20°C (25-30°C). Para além destes factores climatéricos, sistemas de condução que favoreçam uma exuberância da vegetação, porta-enxertos vigorosos e castas sensíveis podem também influenciar a instalação e virulência da doença.

Recomenda-se a remoção dos focos primários de infecção na altura da poda e a realização de tratamentos com produtos fitofarmacêuticos nas condições homologadas oficialmente. Os produtos fitossanitários devem ser empregues em alternância e com recurso a uma correcta tecnologia de tratamentos de modo a proteger os cachos, em particular desde a floração/alimpa ao fecho dos cachos.

Finalmente, o oídio foi a primeira doença de origem americana registada na Europa e é, desde há um século, uma das principais doenças da videira. É um ectoparasita que todos os anos afecta com virulência as videiras nas nossas regiões vitícolas. Os seus danos manifestam-se sobre os órgãos herbáceos, comprometendo a produção directa (através dos ataques ao cacho) ou indirectamente (porta de entrada para a podridão cinzenta).

1.2.4.5 Podridão cinzenta (Botrytis cinérea)

As folhas atacadas apresentam manchas vermelho-acastanhadas, difusas e à periferia do limbo, com o aspecto de queimaduras (Figura 1.11).

Com o tempo chuvoso ou de humidade elevada nessas manchas podem observar-se as frutificações do fungo. Os ataques em folhas raramente são graves. Nos pâmpanos os sintomas manifestam-se pela presença de manchas mais ou menos alongadas, de cor castanha e que com o tempo húmido e chuvoso ficam cobertas de micélio. Nas varas, no final do Verão as zonas atacadas ficam brancas e cobertas de formações negras, esclerotos do fungo. Estas varas atacadas ficam com a consistência branda.

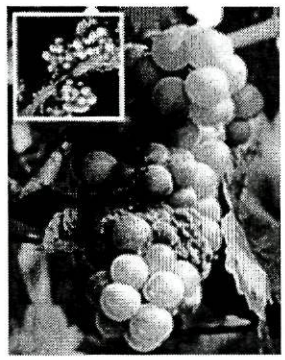


Figura 1.11 – Podridão Cinzenta [4]

Estes sintomas são visíveis na altura da poda. Os cachos são sensíveis à doença em todas as fases do seu desenvolvimento.

Durante a floração/alimpa a podridão cinzenta pode viver sobre os restos de polén e de caliptras causando problemas no vingamento.

À medida que os bagos se desenvolvem o micélio pode permanecer latente no seu interior e, logo que as condições climáticas sejam favoráveis surgem manchas castanhas cobertas pelo micélio acinzentado típico.

Os danos na videira são causados pela forma imperfeita do fungo. A forma sexuada (perfeita) pode ser observada nas castas mais sensíveis, na altura da poda. Os esclerotos formados no final do ciclo vegetativo da videira e o micélio hibernante originam conídios que são disseminados pelo vento e pela chuva. Entre órgãos contíguos os conídios formados a partir do micélio desempenham o papel principal na contaminação.

A temperatura óptima de germinação dos conídios é de 18ºC em presença de água. Ao germinar o conídio produz um tubo germinativo que pode penetrar os tecidos vegetais directamente (o fungo produz enzimas específicas) ou através

das feridas causadas por outras doenças (míldio, oídio), por pragas (traças da uva), por queda de granizo ou por danos mecânicos.

No controlo deste fungo recomendam-se medidas profiláticas tais como as que limitem o vigor das cepas (castas, sistemas de condução, fertilização, etc.), favorecer o arejamento na canópia ao nível dos bagos e controlar outras doenças e pragas. Para além disso há que limitar ao máximo os danos quando da vindima mecânica. Deve-se manter sob vigilância as áreas de cultivo. Os tratamentos fitossanitários devem efectuar-se preventivamente e dirigidos ao cacho. O método usual aponta para 4 épocas de tratamento:

1 - Fim da floração/alimpa

2 - Antes do fecho dos cachos

3 - Início do pintor

4 - 2 a 3 semanas antes da vindima.

As mais importantes são as referenciadas com o nº 1 e 3. Nalgumas regiões pode ser necessário intervir ainda antes da floração quando os riscos de ataques precoces são de prever.

Este é um fungo que pode afectar todos os órgãos herbáceos da videira mas é nos cachos que causa maiores danos. Os maiores prejuízos ocorrem nos períodos da floração/alimpa e do fecho dos cachos/pintor até à vindima. Estes traduzem-se em perdas quantitativas e qualitativas da produção. Afecta também a produção de plantas de videira nos viveiros.

1.3 O Vinho

O vinho é uma bebida alcoólica normalmente produzido a partir de sumo de uvas. Em vários países surgem vinhos feitos a partir de outros frutos que podem ser sujeitos a fermentação, como por exemplo maçãs. Durante a fermentação, microorganismos denominados leveduras digerem os açúcares que se encontram no sumo, produzindo álcool e dióxido de carbono. O produto final dessa fermentação, denominado vinho, tem uma constituição de água (cerca 85 a 89%), etanol (10 a 14%), menos de 1% de ácidos da fruta e centenas de compostos que fornecem características únicas ao aroma e paladar do vinho e que existem em pequeníssimas quantidades.

1.3.1 Breve história do vinho [3,5]

Nos países de tradição vinícola como são quase todos os que se situam na bacia mediterrânea (Portugal, Espanha, Itália, França, Grécia, Chipre, etc.), o vinho sempre fez parte da vida quotidiana dos seus habitantes. No século I A.C., os Romanos assumiram a importância que antes pertencera aos Gregos e Etruscos. Os seus êxitos militares abriram caminho para a realização de numerosos empreendimentos comerciais e consolidaram duas das jóias da agricultura mediterrânea: o Vinho e o Azeite, ampliando as suas zonas de cultivo até à periferia do império – a que chamaram Mundo Civilizado e pouco a pouco foram penetrando no mundo dos bárbaros. Na época do rei de Roma e durante a república, os Romanos não foram amantes do vinho. De hábitos sóbrios, quase espartanos, conheciam mal o vinho e só alguns o bebiam vindo da Grécia. Os poucos vinhos que se produziam eram na sua maioria rústicos, comparativamente aos refinados néctares que queriam rivalizar com a ambrósia que bebiam os Deuses do Olimpo. Nesta época, o sábio romano Catão ditou as normas para a selecção das variedades de cepas mais adequadas e acerca das propriedades que devia ter o terreno sobre o qual se poderia plantar a videira, fazendo também observações sobre o clima e a composição dos solos.

O primeiro gole de vinho que alguma vez atravessou a garganta humana não deixou traço na escuridão da Pré-história. Lamentavelmente para os cronistas, pois a história do vinho está inseparavelmente ligada à história do homem. Se pudéssemos saber o que e como bebiam os nossos ancestrais conheceríamos melhor as peripécias da evolução humana. A primeira bebida alcoólica foi, não resta dúvida, uma espécie de vinho e ninguém ignora que este poderoso catalisador modificou, mais de uma vez, o curso da história da humanidade.

Muito antes da aparição do homem, a terra estava coberta de uma vegetação luxuriante; havia particularmente uma espécie de liana que não era outra senão a antepassada das modernas Ampelidáceas, essa grande família da qual faz parte a *Vitis vinifera*, a vinha que nos dá o vinho. Muitas das suas precursoras ainda sobrevivem e assim encontramos na Europa a *Ampelopsis* que devido à sua robustez se tentou utilizar, sem grande sucesso, como base de enxerto para as variedades de *vinifera* degeneradas ou doentes. O género Vitis

compreende todas as vinhas domésticas, apareceu na Era Terciária, a idade dos primeiros mamíferos. Foi descoberto, perto de um burgo camponês, o fóssil de uma vinha com cinquenta milhões de anos, muito semelhante a certas variedades actuais do Sudoeste dos EUA. Esta *Vitis sezamneusis* era uma planta vigorosa, mas receia-se que não produzisse vinho a despeito das afirmações entusiásticas de certos camponeses.

Uma dúzia de milhões de anos antes do homem, apareceram numerosas variedades de Vitis: assim em França, a *Vitis ausoniae*, com uvas sumarentas, quase idênticas à nossa moderna Vinifera, depois a *Vitis vinifera* "Selvagem", chamada também "*Lambrusca*" cuja descendência permitiu aos primeiros colonos americanos elaborar o seu próprio vinho e que ainda se encontra no seu estado selvagem nas florestas semitropicais das duas Carolinas e do Mississipi.

Quando se trata de determinar qual foi o primeiro homem digno deste nome, cada antropólogo pode ter a sua teoria pessoal, mas, a maior parte admite que há já mais de cem mil anos, as bebidas fermentadas à base de frutas ou de bagos eram conhecidas do homem. Era inevitável que o acaso pusesse o homem em presença da vinha, assim como era suficiente a acção dos fermentos naturais para que as uvas escolhidas e amassadas pelos nossos ancestrais se transformassem em qualquer coisa semelhante ao vinho.

A princípio, a fermentação das uvas guardadas pelos nossos antepassados para a época em que o clima seria pior, teria resultado num grande inconveniente. Mas se o gosto o deixou perplexo, o efeito deixou-o aturdido e finalmente acabou por ficar fortemente satisfeito com a experiência.

Pouco a pouco, o homem familiarizou-se com o fenómeno e aprendeu a dominá-lo com mestria. Suficientemente civilizado e dispondo de tempo suficiente para decorar as suas moradas subterrâneas, o homem de Cro-Magnon (30.000 anos antes da nossa era) terá encontrado tempo para estudar e tirar proveito do fenómeno misterioso da fermentação da uva. Há aproximadamente 8.000 anos, os habitantes das cidades lacustres, da época neolítica, faziam certamente vinho, já que é a conclusão a que se pode chegar a partir da descoberta de montes de graínhas nos vestígios dos seus depósitos de lixo. Estes restos fossilizados ensinam-nos que o homem da

Idade da Pedra variava a sua dieta alimentar: pão, sopa, mariscos, peixe e toda a espécie de carnes.

Relativamente à produção de vinho no nosso país (apontando sempre para a região dos Vinhos Verdes), foi no Noroeste, no coração mais povoado de Portugal desde os tempos asturo-leoneses, que a densa população cedo se espalhou pelas leiras de uma terra muito retalhada.

Sabemos que, na Idade Média, existia vinha semelhante às uveiras que ainda hoje se avistam nas bordas dos campos entre Douro e Minho, conhecidas como vinhas de enforcado e cuja vinificação se realizava em lagares simples, de pedra ou madeira. As uvas pisadas eram espremidas por meio de pressão exercida sobre tábuas que se adaptavam aos lagares e a conservação do vinho era feita em recipientes de madeira, cubas ou pipas, que eram igualmente usadas no transporte de longa distância.

A partir do século XII existem já muitas referências à cultura da vinha cujo incremento partiu da iniciativa das corporações religiosas a par da contribuição decisiva da Coroa.

A viticultura terá permanecido incipiente até aos séculos XII-XIII, altura em que o vinho entrou definitivamente nos hábitos das populações do Entre-Douro e Minho. A própria expansão demográfica e económica, a intensificação do mercantilismo da agricultura e a crescente circulação de moeda, fizeram do vinho uma importante e indispensável fonte de rendimento.

Embora a sua exportação fosse ainda muito limitada, a história revela-nos, no entanto, que terão sido os «Vinhos Verdes» os primeiros vinhos portugueses conhecidos nos mercados europeus (Inglaterra, Flandres e Alemanha), principalmente os da região de Monção e da Ribeira de Lima.

No século XIX, as reformas institucionais, abrindo caminho a uma maior liberdade comercial, a par da revolução dos transportes e comunicações, irão alterar, definitivamente, o quadro da viticultura regional.

Até muito recentemente e já no século XX, predominavam os vinhos tintos, que eram vinhos ásperos, acídulos e de baixo teor alcoólico, sendo consumidos no ano da produção não aguentando qualquer tipo de envelhecimento.

A partir da década de setenta, são os vinhos brancos que dão o nome à região, as vinhas passam a ter novas formas de condução, ainda que de

grande expressão vegetativa, mas adaptáveis à mecanização. Embora se mantenham com teores alcoólicos pouco elevados, são vinhos que atraem novos consumidores tanto no País como no estrangeiro, pela sua frescura de aromas e acidez viva e equilibrada.

A orientação para a qualidade e a regulamentação da produção e comércio do «Vinho Verde» surgiriam no início do século XX, tendo a Carta de Lei de 18 de Setembro de 1908 e o Decreto de 1 de Outubro do mesmo ano, demarcado pela primeira vez a «Região dos Vinhos Verdes».

Questões de ordem cultural, tipos de vinho, encepamentos e modos de condução das vinhas obrigariam à divisão da Região Demarcada em seis sub-regiões: Monção, Lima, Basto, Braga, Amarante e Penafiel.

No entanto, o texto da Carta de Lei de 1908 apenas é regulamentado no ano de 1926 através do Decreto-Lei n.º 12.866, o qual veio estabelecer o regulamento da produção e comércio do «Vinho Verde», consagrando o estatuto próprio da «Região Demarcada, definindo os seus limites geográficos, caracterizando os seus vinhos, e criando a «Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes» instituída para o pôr em execução. Posteriormente, em 1929, o referido regulamento viria a ser objecto de reajustamento através do Decreto-Lei n.º 16.684.

Motivo de grande significado à escala mundial foi a aceitação do relatório de reivindicação da Denominação de Origem "Vinho Verde", apresentado ao OIV (Office International de la Vigne et du Vin), em Paris (1949), e posteriormente, o reconhecimento do registo internacional desta Denominação de Origem pela OMPI (Organização Mundial da Propriedade Intelectual), em Genebra (1973).

O reconhecimento da Denominação de Origem veio assim conferir, à luz do direito internacional, a exclusividade do uso da designação "Vinho Verde" a um vinho com características únicas, devidas essencialmente ao meio geográfico, tendo em conta os factores naturais e humanos que estão na sua origem.

Em 1959, o Decreto-Lei n.º 42.590, de 16 de Outubro, cria o selo de garantia como medida de salvaguarda da origem e qualidade do "Vinho Verde", e o Decreto-Lei n.º 43.067, de 12 de Julho de 1960, publica o respectivo regulamento.

Outro marco de extraordinária importância, foi o reconhecimento de um estatuto próprio para as aguardentes vínicas e bagaceiras produzidas nesta

Região Demarcada (Decreto-Lei 39/84 de 2 de Fevereiro), o que viria contribuir para a diversificação de produtos vínicos de qualidade produzidos nesta Região.

Como consequência da entrada de Portugal na Comunidade Europeia, é promulgada, em 1985, a Lei-Quadro das Regiões Demarcadas, que determinaria a reformulação da estrutura orgânica da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes.

Finalmente, em 1992, é aprovado o novo estatuto pelo Decreto-Lei nº 10/92, de 3 de Fevereiro. Recentemente, foi efectuada uma actualização pelo Decreto-Lei nº 263/99, de 14 de Julho, quanto a diversas disposições relativas à produção e ao comércio da denominação de origem "Vinho Verde".

1.3.2 As etapas da produção de um vinho [2,3,6,7,8]

Pode-se definir vinificação como o conjunto de operações (esmagamento, desengaçamento, maceração pelicular, decantação, maceração, fermentação, sangria, prensagem, adição de sulfuroso, inoculação do mosto, reenchimento, filtragem, mistura, etc.) efectuadas numa adega ou num armazém de vinho, pelas quais se transforma a uva em mosto e depois em vinho, pelo processo de fermentação alcoólica, total ou parcial (vinificação branca, licorosa, espumosa, rosada, tinta). Assim, a vinificação é composta por diversas partes, todas com particularidades essenciais para a qualidade do produto final, muito embora algumas possam não ser realizadas, alterando então as características do vinho.

Algumas características importantes de um vinho começam a ser definidas no momento em que se colhe a uva. Por isso, torna-se muito importante determinar com a maior exactidão, que as modernas tecnologias propiciam, a data da vindima.

Um dos problemas que tradicionalmente prejudicam os agricultores desta região é o facto de a maturação das uvas ocorrer de forma tardia, em virtude dos sistemas de condução adoptados e da grande exuberância vegetativa que provoca grandes zonas de sombra. A aproximação de uma época em que são frequentes as chuvas, após o equinócio do fim de Verão, levava muita gente a antecipar a vindima para fugir ao perigo da podridão.

Os novos sistemas de condução permitem que se atinjam razoáveis pontos de maturação mais precocemente. Tal não significa que as vindimas sejam necessariamente antecipadas, uma vez que existe uma certa tendência para obter vinhos com teor alcoólico mais elevado, resultantes de vindimas tardias.

A data da vindima deve ser determinada por vários factores, entre os quais se salienta a previsão do grau de acidez. É sabido que, à medida que a uva vai transformando os seus ácidos em açúcares, a acidez vai diminuindo e o álcool previsível vai aumentando. Cada casta tem o seu ponto de equilíbrio e mesmo cada produtor pode determinar qual a relação que mais lhe interessa. O princípio, porém, mantém-se: deve ser dada a maior atenção a este indicador.

Quando a vindima começa devem assegurar-se as melhores condições de transporte das uvas para a adega. Devem fazer-se os possíveis para que as uvas cheguem inteiras e não amassadas ou calcadas: nas condições de calor em que a vindima pode ocorrer, tal poderia significar o início precoce da fermentação.

Uma vez chegadas à adega, as uvas são conduzidas para uma prensa, podendo ser previamente esmagadas ou não com o auxílio de um esmagador (Figura 1.12).

A partir deste passo, várias formas de vinificação são conhecidas e podem ser utilizadas. Os exemplos são as vinificações com curtimenta, meia-curtimenta ou bica-aberta. Diz-se que um vinho é feito com curtimenta quando as partes sólidas acompanham o mosto durante a fermentação. Proporciona vinhos corados, encorpados, ricos de extracto seco e taninosos. Os vinhos são corados pois grande parte das substâncias coradas das uvas se encontra na película do bago. À excepção das uvas ditas Tintureiras, a polpa das uvas (tintas ou brancas) é de cor clara, sendo desprovida das substâncias que podem dar cor ao vinho, denominadas antocianas. O facto de serem também taninosos deve-se ao facto de que o tanino se encontra, quase na sua totalidade, nas graínhas do bago.

Um vinho é feito em meia-curtimenta quando as partes sólidas só acompanham parte da fermentação do mosto, ou antes de se ter iniciado a fermentação, ter-se feito a separação de 50% a 60% das partes sólidas e, neste caso, já as partes sólidas podem acompanhar o mosto durante toda a

fermentação. Deste método de vinificação obtêm-se vinhos mais leves e aromáticos.

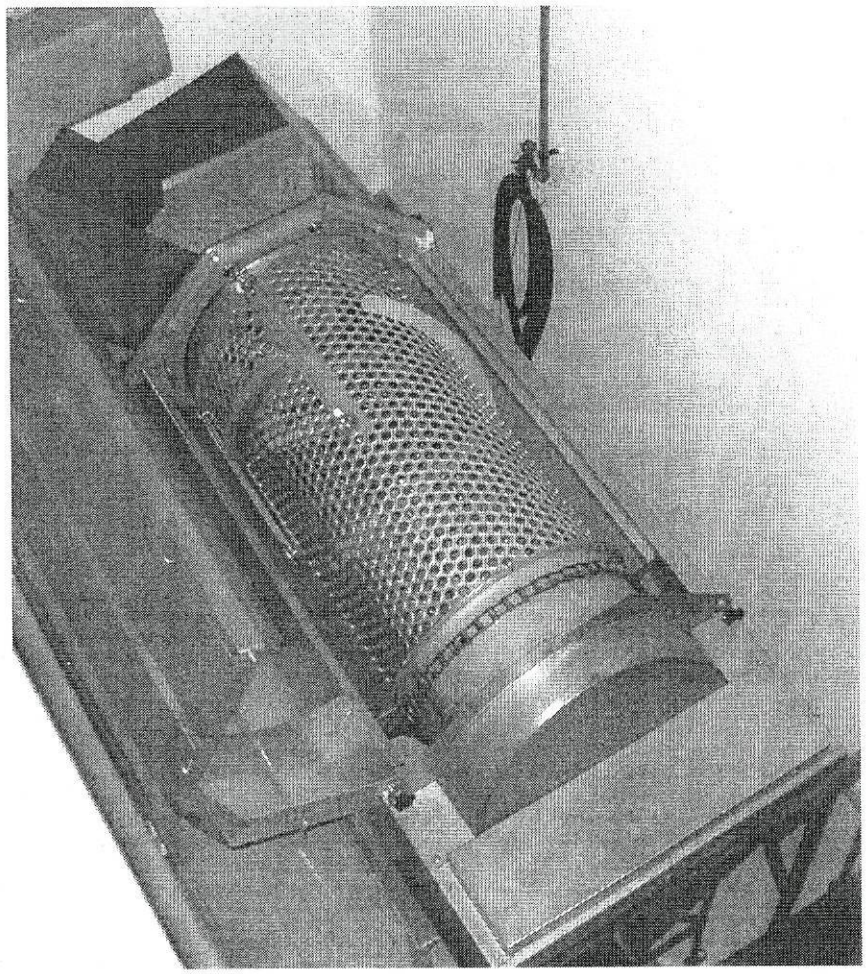


Figura 1.12 – Esmagador existente na Quinta de Azevedo

Diz-se que um vinho é feito de bica-aberta quando se faz a separação das partes sólidas antes de se iniciar a fermentação. Este é o sistema utilizado nos vinhos brancos e rosés de classe. Relativamente aos vinhos rosés, estes resultam exclusivamente de uvas tintas. Esmagadas as uvas, o mosto separa-se da massa ao fim de um determinado número de horas, que logicamente variará com a cor das próprias castas. Sendo muito coradas, o mosto contacta com o bagaço apenas enquanto se procede ao esmagamento e à prensagem. Em castas de pouca cor, há conveniência em se fazer contactar o líquido entre 12 a 24 horas com o bagaço, sem que se desperte a fermentação.

A fermentação alcoólica é um fenómeno bioquímico muito complexo, que provoca a transformação do açúcar (glucose e levulose) em álcool etílico, dióxido de carbono, ácido succínico, ácidos voláteis, ésteres, etc., libertando também energia. Este processo é desencadeado por leveduras, sendo por vezes necessário adicioná-las para que o processo se inicie. Nesses casos, tanto se pode recorrer a leveduras seleccionadas à disposição dos viticultores em organismos oficiais, como produzir, logo no início da vindima, uma quantidade de leveduras a partir de mostos próprios.

Se a reacção ocorrer através de respiração aeróbia, obteremos apenas água, dióxido de carbono e energia, já que a transformação será mais extensa.

A Tabela 1.1 mostra os diferentes constituintes do mosto e do vinho. Como se pode ver, encontram-se no vinho todos os elementos que compõem o mosto menos o açúcar, que foi transformado em álcool. Na realidade, a composição do vinho obtido é muito mais complexa, estando apenas algumas dessas substâncias devidamente identificadas (algumas centenas, quando comparadas com as milhares previstas).

Tabela 1.1 – Principais constituintes do mosto e do vinho

Constituinte	Num litro de mosto	Num litro de vinho
Água	700 a 900 g	700 a 900 g
Álcool	-	45 a 135 g
Açúcar	100 a 250 g	Vestígios
Ácidos orgânicos Fixos	6 a 15 g	Menos que no mosto
Ácidos orgânicos Voláteis	-	0,2 a 0,6 g
Ácidos minerais	0,3 a 1 g	0,16 a 0,85 g
Sais Ácidos	3 a 10 g	até 5 g
Glicerina	-	3,5 a 13 g

Após a ocorrência da fermentação alcoólica, deverá dar-se a fermentação maloláctica. A fermentação maloláctica é a transformação do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono; a fermentação faz-se através de bactérias existentes no mosto que vão ajudar o afinamento dos vinhos com acidez fixa bastante elevada. Esta fermentação dá-se geralmente com os primeiros calores da Primavera, no entanto, em determinados anos e regiões, dá-se ao

mesmo tempo que a fermentação alcoólica. Hoje em dia, com a nova tecnologia, pode ser provocada durante a fermentação alcoólica para elaborar os célebres vinhos novos que podem ser degustados nos finais do mês de Novembro.

A fermentação alcoólica pode ocorrer sem o esmagamento dos bagos de uva, dando-se no interior do bago. A este processo chama-se vinificação com maceração carbónica ou intracelular. A uva é vindimada normalmente, fazendo com que os bagos não sejam esmagados. Os depósitos de vindima enchem-se de dióxido de carbono até a sua metade aproximadamente, pondo depois nos tais depósitos a uva inteira, de maneira que no fundo do recipiente se forme uma fina camada de mosto devido ao peso das uvas, e em seguida são fechadas o mais hermeticamente possível. Começa a dar-se a fermentação, libertando dióxido de carbono que, actua sobre as enzimas presentes na fruta (já que não consegue sair dos depósitos), desencadeando a fermentação nos bagos inteiros.

Posteriormente, após a primeira sangria, realiza-se a remontagem, ou volteio de uma parte da massa semi-sólida, tendo então lugar a primeira fase da fermentação: a intercelular, que pode realizar-se a temperatura de 30º a 35º C e durar cerca de 11 dias.

Em consequência deste procedimento, o aroma primário da uva ficar retido nas células das películas, pelo que se obtêm vinhos muito aromáticos, frutados, com certa carnosidade, cor tinta viva com tonalidades violáceas e uma adstringência marcada.

Durante a fermentação alcoólica, liberta-se bastante calor devido à glicose consumida pelas leveduras. A temperatura elevada pode fazer com que a fermentação alcoólica pare por morte das leveduras e propiciam o aparecimento da indesejável acidez volátil, fazendo com que se perca uma parte considerável de compostos voláteis aromáticos e que se encontrarão em menor quantidade no vinho. Por outro lado, uma temperatura relativamente baixa também pode parar a fermentação alcoólica. A fermentação é impossível abaixo dos 12º C e é tanto mais rápida quanto mais elevada for a temperatura. Por isso, a temperatura de fermentação deve ser controlada dentro de determinados limites, mais favoráveis para a actividade das leveduras.

Geralmente considera-se uma boa temperatura a fermentação alcoólica entre 14º a 18º C para vinhos brancos e de 24º a 27º C para os tintos.

Existem várias formas, mais ou menos sofisticadas, de conseguir controlar a temperatura de fermentação, desde sistemas eléctricos de refrigeração a simples chuveiros sobre cubas de aço inox, passando por adegas bem frescas. O sistema mais adequado é a refrigeração, sendo aliás o mais usado nos centros de vinificação de alguma qualidade. As tinas de fermentação em aço inoxidável são a melhor opção, já que a circulação do líquido refrigerante efectua-se pelas partes laterais, ou as chamadas camisas de refrigeração, onde o seu controlo geralmente é feito automaticamente e comandado por um sistema informático previamente programado. Com este sistema, o controlo da fermentação realiza-se com o total conhecimento do enólogo no que diz respeito a quantidade de açúcar e temperatura do mosto, tendo mais certezas no tipo, características e qualidade do vinho que queira produzir.

Utilizando o controlo de temperaturas, consegue-se que o vinho retenha mais substâncias aromáticas de qualidade e que se formem menos substâncias indesejadas. O vinho é produzido com maior sanidade e qualidade.

Além da temperatura, outros factores podem influenciar a acção das leveduras durante a fermentação alcoólica. Os factores são a temperatura, o oxigénio, o dióxido de carbono, o álcool, a acidez e o dióxido de enxofre (gás sulfuroso).

A temperatura óptima de uma fermentação será à volta dos 25° C. As fermentações abaixo dos 20° são mais lentas e demoradas, mas o vinho resulta com mais perfume, menos corpo e mais pobre em cor do que teria se a temperatura fosse mais elevada; é então um vinho delicado e aromático. Quando a temperatura é superior a 32° ou 33°, as bactérias desenvolvem-se mais à vontade, especialmente a Manite, em todo o caso, a bactéria da Azedia (*Acetobacter*) só muito excepcionalmente se desenvolve acima de 33°.

As leveduras são seres vivos e, à semelhança dos seres superiores, alimentam-se e reproduzem-se. Para se reproduzirem necessitam de oxigénio e quanto mais lhes facultarmos este elemento, mais lhe favorecemos a vitalidade. Mas há uma circunstância, ligada ao fenómeno fermentativo, que coloca à nossa disposição os meios de tirar do trabalho das leveduras o melhor rendimento. É que a levedura alcoólica, aeróbia por natureza, suporta

igualmente a vida anaeróbia, isto é, sem ar (principalmente o oxigénio) ou dispondo dele em quantidade diminuta, ela continuará a viver reproduzindo-se embora com mais lentidão, porque vai buscar forçadamente ao açúcar, através do seu desdobramento em álcool e dióxido de carbónico, os elementos de que carece. Assim, o álcool é, na sua maior parte, o resultado das dificuldades da vida encontrada pela levedura.

Depreende-se assim que quanto mais oxigénio, maior será a reprodução e menos trabalho rentável para a vinificação: quanto menos oxigénio, menor a reprodução e mais trabalho útil.

Conclui-se então, que as massas devem ser bem arejadas no início da fermentação, para que as leveduras despertem mais rapidamente e se multipliquem à vontade. Mas logo que a fermentação esteja bem despertada o arejamento deve cessar, para que as leveduras vivam ao abrigo do ar e possam produzir álcool em quantidade.

Relativamente ao dióxido de carbono, quando está presente em grande quantidade e pressão elevada, este contraria o trabalho das leveduras. Nos espumantes naturais ele serve, em parte, como protecção contra possíveis fermentações do açúcar que, regra geral, contêm.

O álcool é um anti-séptico e, por isso, exerce a sua influência no decorrer da fermentação, especialmente no final, pois desde que a graduação ultrapasse os 14°, ela prossegue com dificuldade. Acima dos 16°, não sendo impossível, só em casos muito raros se verifica e daí o motivo por que os vinhos generosos e licorosos requerem como mínima tal graduação para os conservar ao abrigo de qualquer acidente (denominado desdobro).

Nem todas as leveduras suportam a mesma percentagem de álcool no meio em que vivem; por isso umas leveduras são responsáveis pelo início da fermentação, enquanto outras a completam.

Enquanto a acidez do meio permite a vida das leveduras ela é, pelo contrário, hostil ao desenvolvimento das bactérias, pelo que concluímos que, se o mosto for bastante ácido, as leveduras desenvolvem livremente, ao passo que as bactérias ficam imobilizadas. No entanto, a acidez é também importante para as qualidades do vinho enquanto alimento, pelo que qualquer correcção ácida deve ser bem pensada.

As leveduras podem viver em meios que contenham determinadas doses de dióxido de carbono, enquanto as bactérias com essas mesmas doses ficam sem acção ou são destruídas.

O emprego de gás sulfuroso é uma grande vantagem na vinificação porque permite eliminar ou pelo menos reduzir, dentro de certos limites, a concorrência das bactérias relativamente às leveduras. Este gás tem por isso uma acção purificadora importante. É um anti-séptico, como se pode ver que, sob a sua acção e em doses crescentes, vai desaparecendo a vida existente no mosto pela ordem seguinte: primeiro, morrem as bactérias, seguida da morte de algumas leveduras (a apiculata, por exemplo). Finalmente, e apenas quando está presente em quantidade muito elevada, o gás sulfuroso mata as leveduras elípticas.

Após as fermentações alcoólica e maloláctica, pode ser necessário proceder a algumas operações de conservação e tratamento dos vinhos. Alguns exemplos dessas operações são o atesto, a trasfega (ou transfega), as clarificações e as lotações. De seguida é feita uma pequena descrição de cada uma destas operações.

Entende-se por atesto a ocupação do espaço vazio, introduzindo vinho na vasilha até o encher completamente. Assim evitam-se as doenças da flor, da azedia e o desenvolvimento de bolores na parte da vasilha em vazio, que poderiam transmitir ao vinho o cheiro a bolor ou bafio.

Deve-se ter o maior cuidado com o vinho dos atestos já que uma pequena quantidade de vinho doente adicionado a uma grande cuba de vinho são contamina-o e torna-o também doente. Acontece algumas vezes que, por falta de vinho para atestar, algumas vasilhas permanecem em falta por um período mais ou menos longo. A conservação destes vinhos está sempre em perigo. Conforme o espaço em vazio, recorre-se a um dos seguintes processos, que visam evitar o contacto do ar com a camada líquida:

- Introduzindo na vasilha seixo bem lavado;
- Azeite puro, de baixa acidez, vertido pelo batoque, formará uma camada fina de gordura isoladora;
- Óleo de vaselina ou de parafina, gorduras que não formem ranço, como o azeite;
- Dióxido de carbono, preenchendo todo o vazio.

A trasfega (ou transfega) consiste em mudar o vinho (ou seu precursor) mais ou menos claro para uma vasilha limpa, separando-o das borras acumuladas no fundo das vasilhas. Á medida que o fenómeno da fermentação decresce e o frio se faz sentir, o vinho vai se tornando mais limpo, acumulando no fundo da vasilha um depósito, que constitui a borra ou mãe do vinho.

Este depósito é composto principalmente por detritos vegetais, bitartarato de potássio, matéria corante, substâncias albuminóides, leveduras, bactérias e impurezas trazidas pelas uvas (restos de enxofre, sulfato, terra, etc.).

O vinho, de uma maneira geral, não sai beneficiado com o contacto das borras. Antes pelo contrário, os inconvenientes podem ser tão grandes que chegam a produzir a sua ruína.

A clarificação, como o termo indica, é a operação que tem por fim eliminar as impurezas em suspensão de um vinho, tornando-o límpido. Para se clarificar os vinhos, a prática vinícola emprega geralmente as colagens e a filtragem.

As principais causas da turvação de um vinho são:

- O trabalho fermentativo das bactérias ou das leveduras quando desdobram a quantidade final do açúcar existente; se esse trabalho fermentativo for acompanhado de desprendimento gasoso, a turvação é bastante provável.

- A pobreza em tanino. Sempre que um vinho for pobre em tanino (vinhos brancos vinificados de bica-aberta, etc.) as substâncias albuminóides têm dificuldade em coagular e por isso, a sua precipitação é muito lenta. Um vinho nestas condições é mais difícil de se tornar limpo e, como consequência, apresenta-se turvo durante muito tempo.

- A existência de casses. Todo o vinho que tenha casse mostra-se mais ou menos turvo conforme a intensidade da doença e grau de arejamento que tenha sofrido. O fenómeno das casses será explicado mais à frente.

A colagem e a filtragem são duas operações que se confundem quanto ao efeito produzido no vinho: torna-los límpidos. Mas enquanto as colagens arrastam as substâncias em suspensão e algumas dissolvidas, as filtrações só eliminam as partículas em suspensão. A colagem, além de dar limpidez ao vinho, modifica algumas das suas características, já que pode eliminar algum tanino do vinho, matéria corante e cheiros ou sabores diversos.

Assim, um vinho com tanino em excesso amacia depois de uma colagem. Se, pelo contrário, for pobre em tanino, a sua adição antes da colagem, é

vantajosa. Um vinho branco, cor de palha, torna-se mais aberto (vinho com pouca cor ou de cor clara) com uma colagem, principalmente se esta se efectuar com a caseína.

Cheiros a bafio, madeira, etc., tornam-se atenuados após uma colagem. Entre as substâncias mais utilizadas nas colagens dos vinhos encontram-se:

- Clara de ovo
- Leite fresco
- Caseína
- Gelatina
- Barro de Espanha.

Lotação é a mistura de dois ou mais vinhos tendo em vista melhorar pelo menos um deles. Os vinhos variam, dentro de um certo limite, de colheita para colheita, e só com a sua mistura se pode manter o mesmo tipo de qualidades. Para homogeneizar estas qualidades recorre-se à lotação antes de os lançar no mercado.

Com as lotações podemos ainda corrigir certos defeitos dos vinhos. Assim, um vinho de baixo teor alcoólico lotado com outro bastante alcoólico permite-nos obter um vinho de teor intermédio. Deste modo evita-se a aguardentação do vinho de teor alcoólico inferior. Pode haver também conveniência na mistura de um vinho encorpado com um mais delgado, de um vinho aromático com outro sem aroma, etc. A prática das lotações é uma das operações mais delicadas e para isso é necessário a capacidade de um bom provador.

Antes do engarrafamento do vinho, é muitas vezes necessário proceder a um tratamento pelo frio. Este tratamento serve para prevenir futuras precipitações de tartaratos, que ocorrem geralmente quando o vinho é conservado em locais bastante frescos. Assim, o vinho é colocado a uma temperatura negativa durante um período de tempo razoável (pelo menos 7 dias), de forma a provocar a precipitação dos tais sais. Apesar dos tartaratos não terem qualquer influência nas qualidades do vinho, o consumidor não encara com a mesma naturalidade este fenómeno. Por isso, não vê com bons olhos a aquisição de um vinho que contém um depósito no fundo da garrafa, sendo que esta retornará invariavelmente à empresa que o comercializa. Daí o empenho que as empresas, de uma forma geral, aplicam no tratamento dos seus vinhos pelo frio.

Após o engarrafamento, ocorre o envelhecimento do vinho. Geralmente este ocorre temporariamente em cubas/pipas preparadas para o efeito ou então, na própria garrafa. O vinho tem três períodos na sua vida: primeiro, a infância, durante a qual se está a formar e as suas qualidades vão melhorando até que, chegando a uma certa idade, está completamente constituído e atinge o momento áureo, no qual permanece durante algum tempo para depois entrar na decadência ou decrepitude, antes da qual deve ser bebido.

No envelhecimento ocorrem fenómenos de oxidação. Tem que se distinguir o envelhecimento do avelhamento, porque um vinho idoso pode estar avelhado (sem qualidades), ou porque as perdeu já ou porque não chegou a adquiri-las. O que quer dizer que há bom e mau envelhecimento, para os quais contribui basicamente a composição e toda a complexidade do vinho.

Na composição do vinho, tomam importância os polifenóis, o grau alcoólico, os ácidos presentes, elementos em pequeníssima quantidade, a temperatura e o oxigénio, que determinam o envelhecimento, ideal ou desordenado, e que por isso mesmo, requerem um controlo sensato.

Concluindo, o vinho não é um líquido inerte. Devido à intervenção de células vivas na vinificação a sua composição apresenta uma grande complexidade. Os diferentes constituintes reagem uns com os outros e conforme o tempo vai passando, a sua cor modifica-se, suaviza-se e, pouco a pouco, começa por formar-se o bouquet e toda a sua estrutura se vai transformando e amadurecendo, modificando toda a sua personalidade o que faz com que ao fim de um determinado tempo, o enófilo mais atento possa desfrutar, por exemplo, das suas notas de baunilha, corpo esbelto, veludo confortante, cores bonitas tranquilas e repousantes, com reflexos de cristais cintilantes que maravilham os nossos sentidos.

O vinho pode envelhecer por redução ou oxidação.

No caso da redução, o álcool e os ácidos fixos transformam-se em ésteres (ocorrendo em garrafa ou recipiente inerte).

Já no caso da oxidação, o álcool e os ácidos, na presença de oxigénio transformam-se em ésteres (ocorrendo em contacto com casco de carvalho).

Relativamente à evolução da cor, com a precipitação da matéria corante, tanino e hidrogenotartarato de potássio, dá-se o descasque, o que torna o vinho tinto mais claro, enquanto o oposto acontece com o vinho branco. Um

destilado só pode envelhecer por oxidação. No caso de uma aguardente vínica, como destilado que é (ou seja, uma solução de álcoois em água, contendo algumas substâncias aromáticas), não contém ácidos, pelo que não pode envelhecer por redução, mas apenas por oxidação.

No casco, pouco a pouco, a aguardente vai extraindo da vasilha algumas substâncias: Tanino, Ácidos vários, Açúcar, Matérias corantes, etc.

Em breve a aguardente deixará de ser um produto neutro, para se sujeitar às reacções benéficas provocadas pelo oxigénio presente no vasilhame ou chegado através dos poros da madeira.

A qualidade da madeira empregue no fabrico de cascos tem grande importância para a conservação e evolução do vinho. As madeiras de carvalho contribuem para afinar as características organolépticas dos vinhos e das aguardentes. Os carvalhos com maior interesse em tanoaria são os seguintes: Carvalho Português (*Quercus Lusitânia*), Carvalho das Canárias (*Quercus Canariensis*), Carvalho Séssil (*Quercus Sessiliflora*), Carvalho Vermelho das Américas (*Quercus Boreatis*), Carvalho Roble (*Quercus Robur*) entre outros.

Existem diversos tipos de Carvalho, consoante a zona de origem, no entanto os enólogos dão preferência à madeira de grão mais fino, menos poroso, rico em baunilha e suaves em taninos.

Relativamente à madeira de carvalho usada no fabrico de cascos, os especialistas concluíram que os provenientes de Limousin, Allier, Nevers e Tronçais (zonas francesas), Virgínia, New Orleans e Ohio (zonas dos Estados Unidos da América) e Rússia são as preferidas para o bom estágio dos grandes vinhos produzidos em todo o mundo do vinho [2].

Em qualquer fase da produção do vinho, este pode ser sujeito a alterações indesejáveis. Estas podem ser de origem microbiana, química ou até fisiológica. Serão feitas breves descrições sobre alguns dos acidentes mais comuns.

O estudo das doenças e defeitos dos vinhos é uma das partes mais importantes da enologia, e cujo conhecimento deve interessar aos que dela se ocupam.

O vinho proveniente de uma vinificação cuidada e inteligente não deve adoecer. Se as uvas forem devidamente escolhidas, evitado o contacto com utensílios de metal, o mosto bem corrigido, a fermentação racionalmente

acompanhada e todas as demais operações devidamente executadas, empregando material desinfectado e limpo e, por fim, desde que o vinho esteja bem conservado, não se deve recear as doenças. Está-se, porém infelizmente, muito longe desta aspiração e, na realidade, a percentagem de vinhos doentes é grande.

As doenças são devidas a micróbios, a fermentos solúveis ou a acções químicas que alteram a constituição do vinho e modificam desagradavelmente as suas características organolépticas. Os agentes microbianos para se propagarem precisam de encontrar condições favoráveis à sua multiplicação, como por exemplo, temperatura apropriada, falta de acidez, fraca percentagem de álcool, presença de açúcar e albuminóides. Relativamente às doenças propriamente ditas, estas afectam a conservação dos vinhos, desvalorizando-os ou inutilizando-os como produtos de consumo. É que todo o mal causado pelas doenças dos vinhos não tem remédio, seja ele qual for. As doenças evitam-se, não se curam.

Dos microrganismos que provocam nos vinhos o estado doentio, uns necessitam do oxigénio (aeróbios) do ar para viverem, outros vivem isolados do ar (anaeróbios) e podem inutilizar um vinho mesmo com a vasilha bem atestada.

Na prática, um vinho doente reconhece-se pela prova e pela determinação da sua acidez volátil: muitas vezes a prova de boca acusa-nos a doença do vinho (manite) e, geralmente, a prova de cheiro acusa-nos a acidez volátil, desde que esta atinja mais de 1 grama por litro, expressa em ácido acético.

Temos como exemplos de alterações de ordem microbiana a flor, a azedia, a manite, o amargo e a gordura, que serão objecto de pequenas descrições.

Nem toda a flor formando películas ou véus à superfície dos vinhos tem carácter doentio; na sua maior parte, os véus são devidos, não a bactérias mas sim, a certas espécies de leveduras alcoólicas, as quais, terminada a fermentação, procuram à superfície do vinho condições de subsistência. Das mais vulgares é o *Saccharomyces Oviformis*, responsável pelos véus que são normais nos vinhos de Jerez e do Jura, e aos quais se atribui o seu aroma particular, razão de se apelidarem tais véus de flor nobre [2].

A flor propriamente dita, vulgar nos vinhos pouco graduados, quando em vazio, é ocasionada por um fermento, o *Mycoderma Vini*, que ataca a glicerina e o álcool, e os transforma em água e anidrido carbónico.

A flor é a gripe dos vinhos: pouco perigosa em si mesmo, representa uma porta aberta para as outras doenças, principalmente a azedia.

Relativamente à azedia, o *acetobacter*, fermento do azedo, para viver precisa de estar em contacto com o ar. Constitui, à superfície do vinho, um véu semelhante ao da flor, mas menos espesso e de cor diferente. O micróbio, com o oxigénio que vai buscar à atmosfera, oxida o álcool do vinho transformando-o em ácido acético.

A volta é provocada por uma bactéria (*bacterium tartarophtorum*) que, contrário das outras já mencionadas, vive ao abrigo do ar. Esta bactéria ataca o hidrogenotartarato de potássio, ácido tartárico, tanino e a glicerina, dando-nos ácido láctico, acético e propiónico. O vinho apresenta-se ligeiramente gasoso, turvo e com o cheiro característico do formigo que lhe é dado pela presença do ácido propiónico.

A Manite é uma doença própria das regiões quentes e, por isso, mais vulgar no Sul do País. É a doença dos vinhos que fermentam a uma temperatura alta. O fermento dessa doença manifesta-se quando a temperatura de fermentação é superior a 33° ou 35° C. O fermento da manite ataca um dos açúcares da uva, a levulose, transformando-o em ácido acético, láctico, dióxido de carbono e manite o que, juntamente com o ácido láctico, imprime ao vinho um sabor indesejável (agridoce), nome pelo qual a doença é também conhecida. Por outro lado, o cheiro do vinho é pouco prejudicado.

A doença do amargo é peculiar nos vinhos tintos velhos. Esta doença não deve ser confundida com o gosto amargo adquirido por certos vinhos, passado algum tempo depois de serem engarrafados ou trasfegados com exposição ao ar, pois que estes outros amargos não são devidos a germes organizados, mas sim, a uma acção puramente química, assim como, igualmente, nada tem de comum com o amargo adquirido por alguns vinhos provenientes de uvas afectadas pelo míldio [2].

A bactéria ataca os vinhos velhos, pouco ácidos e principalmente os tintos ricos em tanino. O amargo é produzido por uma bactéria com um ciclo evolutivo longo. Quando engarrafados, os vinhos atacados tornam-se manifestamente

amargos e acusam abundância de ácidos voláteis, registando-se ao mesmo tempo um ténue aumento da acidez total.

Esta bactéria ataca a glicerina, o ácido tartárico, tanino e a matéria corante, etc., originando um vinho com uma cor menos viva, passando a manifestar o amargo, reconhecendo-se um ligeiro sabor de fermentação como gosto a alhos podres, facto que é devido à presença do ácido butírico.

A gordura é uma doença frequente nos anos em que a podridão ataca as uvas de forma generalizada. As bactérias que lhe dão origem, ficando suspensas no vinho, tomam-no gorduroso pela sua própria morfologia. Quando a doença está adiantada, o vinho corre em fio como o azeite.

Existem também alterações de ordem química. As casses são os exemplos mais comuns deste tipo de fenómenos. De seguida é feita uma descrição das casses férricas, branca e cúprica.

De uma maneira geral denominam-se casses as doenças de origem não microbiana, verdadeiras alterações químicas, cuja manifestação final é a mudança de cor, turvação e formação de depósito mais ou menos abundante do vinho, com alteração mais ou menos sensível no sabor, na cor e no aroma.

Tal como o seu próprio nome indica, a casse férrica é devida ao ferro existente no vinho. Os vinhos contêm pequenas quantidades de ferro, na ordem dos 5 a 30 miligramas por litro. A presença desta substância nos vinhos retarda a sua limpidez e, quando cristalinos, podem turvar após a trasfega. O ferro dos vinhos pode ter duas origens. Pode provir do terreno em que a vinha está instalada, ou ser captada pelos mostos ou pelos vinhos no seu contacto com os utensílios e com os recipientes das adegas. Por outro lado, o ferro é benéfico para o organismo humano, quando em pequenas quantidades.

A casse branca é a alteração de um vinho oxigenado pela presença de ferro, quer seja branco ou tinto, em que o vinho turva, adquirindo uma tonalidade leitosa no primeiro caso e azul ou negro no segundo. Quando num copo, e ao fim de 24 horas, o vinho turva, dando lugar a um depósito de cor azul se o vinho é rico em tanino (tanato férrico), como é o caso dos vinhos tintos e dos brancos feitos de curtimenta. Esta é a casse férrica propriamente dita.

Tratando-se de vinhos brancos de bica-aberta com pouco tanino, o ferro precipita na forma de fosfato férrico, que lhes dá o aspecto leitoso. O depósito

surge, não azul, mas esbranquiçado. É uma variante da casse férrica que se denomina casse branca.

Se, por outro lado, existir cobre nos vinhos, pode ocorrer a casse cúprica. O cobre dos mostos, à parte uma pequena percentagem absorvida dos terrenos, provém dos resíduos deixados pelas caldas (soluções preparadas para serem aplicadas na videira com o intuito de combater algumas pragas e doenças) sobre as uvas. A forma de processar a casse cúprica é colocar um vinho filtrado em tonéis ou cascos e, especialmente, em garrafas turvas uma vez subtraído o contacto com o ar. Quando o vinho estiver arejado, por trasfega ou desarolhamento das garrafas, em breve se tornará limpo. Quer dizer, este é o fenómeno contrário daquele que se passa na casse férrica. Para que o ferro se manifeste é necessário uma oxidação e a casse cúprica provém de uma redução.

Finalmente, existem também alterações de ordem fisiológica, como por exemplo, a casse oxidásica (ou castanha). Esta doença, ao contrário das que foram descritas acima, não é devida a micróbios. É provocada sim, por um fermento solúvel oxidante, segregado por um fungo muito frequente nas uvas podres, que se chama *Botrytis Cinerea*.

Através deste fermento, a matéria corante do vinho é oxidada, tornando-se insolúvel e precipitando depois no fundo das vasilhas. O sabor e o aroma do vinho modificam-se, adquirindo um gosto e cheiro a cozido. Quanto à cor toma a tonalidade do café, se se trata de um vinho branco, ou do tijolo, se for um vinho tinto. Assim, os tintos ficam descorados e os brancos escurecem.

Existem ainda outras alterações fisiológicas relevantes:

Alteração de sabor e cheiro – As alterações à prova, além das que são inerentes às doenças microbianas, são defeitos cuja origem pode estar já nas uvas, derivar de deficiente vinificação, ou podem ainda ser o resultado de envasilhamento em más condições. Quase sempre os defeitos de prova se revelam tanto no paladar como no cheiro dos vinhos.

Sabor a enxofre – É um cheiro a ovos podres, e pode ser originado pelo enxofre que vem aderente às uvas, pelas mechas ou pelo trabalho das leveduras, que atacam o dióxido de enxofre disolvido em determinadas circunstâncias.

Gosto a alhos – Resulta da combinação do sulfídrico com o álcool.

Gosto a sulfito – Resultante do uso em excesso deste composto, prejudica o sabor do vinho quando em quantidades excessivas e dá mal-estar a quem o bebe, normalmente, dores de cabeça, etc.

Sabor adstringente – Resultante da abundância de matérias tanóides resultantes das curtimentas muito prolongadas.

Gosto a bolor – Provém este gosto do contacto dos vinhos com a madeira bolorenta, ou da utilização de uvas podres.

Cheiro a rolha – O cheiro transmitido por uma rolha de má qualidade, ao vinho contido em garrafa. Encontra-se principalmente em vinhos velhos.

Aldeídos – Os aldeídos comunicam um muito inconveniente aos vinhos.

Existe ainda a doença de garrafa ("Maladie de bouteille").

O vinho não deve nunca ser consumido logo após o seu engarrafamento. É necessário deixá-lo repousar de um a três meses, conforme os vinhos, daquilo que os especialistas chamam a doença da garrafa.

Com efeito, todas as operações suportadas pelo vinho, por mais delicadamente que elas tenham sido empreendidas. O engarrafamento é para ele um choque. Qualquer sistema de engarrafamento, mesmo o mais aperfeiçoado, faz o vinho sofrer uma aeração intempestiva que atenua por algum tempo o seu aroma, privando-o das suas qualidades.

Logo que tenha desaparecido o efeito oxidante do ar, o vinho vai pouco a pouco readquirindo o seu equilíbrio, primeiro ainda bastante precário, mas em seguida, se se tratar de vinho para envelhecimento, vão surgindo e desabrochando novas qualidades.

1.3.3 A vinificação de uvas brancas [6]

Nesta pequena secção será explicada com maior pormenor a vinificação de um vinho branco, o que interessa para a compreensão das actividades desenvolvidas realizadas em termos da vinificação realizada durante o trabalho.

O método de vinificação usado nos vinhos brancos consiste em fazer fermentar o mosto depois de prensadas as uvas e, portanto, sem a presença dos outros elementos que compõem o cacho. Este método recebe o nome de bica aberta.

Depois de "defecar", ou seja, de deixar sedimentar as substâncias sólidas mais pesadas, o mosto dos vinhos brancos é trasfegado para novo recipiente

onde vai fermentar. Depois da fermentação estar completa ou o grau de avanço ser considerado suficiente, procedem-se aos tratamentos de conservação e posterior engarrafamento do vinho.

O vinho branco é elaborado pela fermentação do sumo de uva, normalmente sem a maceração (contacto entre o sumo das uvas e as partes sólidas) das partes sólidas do cacho. Os melhores vinhos brancos não contêm, geralmente, elementos provenientes das películas, das graínhas e muito menos do engaço. A vinificação de uvas brancas é conduzida de forma a evitar a dissolução directa ou enzimática dos componentes do bagaço.

Do ponto de vista prático, na vinificação em tinto, a trasfega e a prensagem são posteriores à fermentação alcoólica, o que não acontece na vinificação em branco, em que estas precedem à fermentação.

Ao contrário do que acontece com os vinhos tintos, os tipos de vinhos brancos são extremamente variados [6]. Podem ser aromáticos, ou de aroma leve, secos, meio secos, doces ou licorosos, tranquilos ou vivos, espumantes, frescos e frutados ou madeirizados, fortificados com álcool, envelhecidos em madeira ou conservados jovens em cubas herméticas. Segundo as uvas sejam muito maduras, pouco maduras, passificadas, segundo o seu estado sanitário e a natureza do apodrecimento até ao apodrecimento nobre, a riqueza dos mostos pode variar de 10 a 20° Baumé. São conhecidos vinhos secos excelentes que atingem 5 a 6 gramas por litro de acidez total enquanto outros, com a mesma qualidade, têm no máximo 3,5 gramas.

Esta diversidade de gosto e de composição corresponde a diferentes técnicas de vinificação. O trabalho de preparação do mosto pode comportar sucessivamente as operações de esmagamento, esgotamento, prensagem, sulfitação, defecação do mosto e de clarificação. Mas nenhuma destas operações é realmente indispensável para fazer o vinho. Existe também uma regra, segundo a qual, todas as operações devem ser realizadas de forma rápida, para evitar o contacto com o ar e consequente oxidação.

A forma usada na colheita das uvas é essencial e determinante para o vinho que se vai produzir. Existe a opinião que um vinho branco sem aroma não é mais que uma solução alcoólica acidulada. O aroma secundário é dado por uma fermentação sã, através da nota dada pelos álcoois superiores (álcoois de cadeia longa) e pelos seus ésteres. Já o aroma primário é dado pela uva,

dependendo da casta, do estado de maturação das uvas e do seu estado sanitário. O aroma da uva branca está localizado na película e nas células subjacentes, aparecendo cedo, muito antes da maturação ser completa, de tal forma que uma colheita precoce pode dar vinhos tão aromáticos e, muitas vezes, mais finos do que os de uma colheita tardia. Neste aspecto, a diferença relativamente aos vinhos tintos é significativa. A evolução do aroma observada em vinificações comparadas, com uvas da casta Sauvignon, colhidas em diversos estados de maturação, é a seguinte [6]:

- Para as uvas colhidas pouco depois da coloração, o odor é forte mas "verde"; lembra uma folha quebrada ou a pele de uva mastigada;
- Mais tarde, o aroma torna-se mais fino, aparecendo os frutados e torna-se agradável até 15 dias antes de se atingir o grau de maturação óptimo;
- Ainda mais tarde será mais maduro, mais rico em perfume de ácidos gordos, mas mais pesado, tendo menos vivacidade.

Nas regiões quentes não é necessário nem recomendado esperar pela maturação completa para obter vinhos frutados. Nestes casos será necessário vindimar bastante mais cedo de forma a encontrar um maior equilíbrio ácido. Para além do seu aroma, a harmonia de um vinho branco relaciona-se com a sua frescura, quer dizer, com uma acidez suficiente.

Uma colheita precoce tem também a vantagem de evitar graduações demasiado elevadas. Um bom vinho seco deve ter cerca de 11° de álcool. Se o valor for inferior, o vinho pode ser fraco, a não ser que seja bastante rico em aroma. Se o valor for superior, o vinho será quente e demasiado graduado para ser bebido em quantidade.

Os melhores vinhos brancos secos são elaborados a partir de uvas sãs. Logo que o apodrecimento aparece, mesmo que em pequena proporção, os vinhos são de qualidade inferior. Será então mais importante elaborar vinhos brancos a partir de uvas sãs do que com uvas maduras. Será talvez aconselhável fazer a vindima manualmente, escolhendo as uvas à mão, eliminando os cachos ou bagos que apresentam sinais de podridão. Após a recolha dos cachos, deve-se evitar o esmagamento das uvas durante o transporte, de forma a prevenir fenómenos de oxidação e maceração que serão nefastos.

Actualmente os enólogos dedicam cada vez mais atenção aos tratamentos mecânicos das uvas e aos fenómenos que intervêm depois do esmagamento e

da prensagem, tendo em vista o melhoramento da qualidade do vinho produzido. As instalações e equipamentos utilizados para a produção de vinhos brancos de qualidade têm evoluído no sentido de permitir a preparação rápida dos mostos, a sua clarificação e a dos vinhos, assim como o controlo e ajuste da temperatura de laboração. Tem vindo a tornar-se cada vez mais difícil produzir um vinho branco seco de qualidade em condições artesanais devido, principalmente, às modificações de gosto do consumidor e à necessidade do aumento de produção.

Serão seguidamente descritas algumas fases importantes da vinificação de uvas brancas, atendendo às suas particularidades e características mais importantes.

O esmagamento tem por fim provocar a ruptura das películas e desembaraçar a polpa. A sua acção deve ser suficiente para separar o sumo mas sem despedaçar as partes sólidas. Existem duas razões fundamentais para que não se faça o desengace das uvas brancas: a primeira é que este processo será necessariamente acompanhado de uma movimentação da vindima esmagada, que produz muito lixo e depois porque torna a separação do mosto por prensagem mais difícil, já que os cangos dão ao bagaço uma certa elasticidade e facilitam a drenagem do sumo.

Se o método champanhês for utilizado, como exemplo, as uvas são prensadas no seu estado intacto, sem qualquer processo de esmagamento prévio. É a compressão dos bagos que liberta o sumo. Este processo permite extrair sumo muito pouco colorido, mesmo de uvas tintas.

A principal vantagem de não se efectuar o esmagamento é que o mosto passa a conter poucos detritos devido a não ocorrer trituração dos bagos.

O esgotamento consiste em separar o sumo liberto pelo esmagamento. Pode-se distinguir o esgotamento estático, que se efectua por simples repouso da vindima esmagada, e o esgotamento mecânico, ou dinâmico, que tem acção mais rápida.

O esgotamento é uma operação difícil de realizar e que, se não for correctamente realizada, pode traduzir-se numa diminuição da qualidade do vinho produzido. Toma formas diferentes segundo a importância dos volumes a tratar, a qualidade desejada e as instalações de que se dispõe. O esgotamento mais vulgar consiste em fazer cair a vindima esmagada directamente do

esmagador para a caixa da prensa. O sumo escorre durante o tempo em que a caixa vai sendo cheia, sendo a prensagem iniciada quando a caixa está cheia, dando-se o esgotamento como suficiente. Este processo é realizado desta forma em pequenas propriedades. Se o volume de vinificação é bastante grande não é possível utilizar este método, recorrendo-se a câmaras de esgotamento onde se realiza a separação estática. Não são mais do que cubas abertas (com diversas formas possíveis) e de fundo inclinado, com uma abertura, que permite o escoamento do mosto e o carregamento das prensas por gravidade.

O esgotamento estático tem a vantagem de produzir mostos pouco sujos. No entanto dá origem a uma dupla oxidação, ao nível das uvas esmagadas e ao nível do mosto que corre, provocando também uma maceração prolongada. Por estas razões as câmaras de esgotamento não permitem a produção de vinhos brancos de qualidade superior, sendo frequentemente substituídas por esgotadores mecânicos.

Os esgotadores mecânicos têm diversos modelos: cilindro rolante, peneiras horizontais animadas de agitação ou parafuso sem fim inclinado, fazendo subir a vindima esmagada até uma gárgula perfurada. Numa instalação bem pensada, o esgotador deve ser colocado por baixo do esmagador, sendo alimentado directamente por gravidade. O esgotador mecânico tem um rendimento de separação do sumo bastante maior do que o esgotamento estático.

O mosto de esgotamento é recebido dentro de uma cuba colocada debaixo do esgotador. Evita-se o escorrer do mosto, a sua queda em chuva, em cascata, com uma gárgula de recolha e um tubo de transporte até ao fundo da cuba.

A prensagem tem por fim extrair o mosto pela pressão exercida sobre a vindima entretanto esmagada e esgotada. A extracção deve ser limitada ao sumo doce, excluindo as películas, graínhas e cangos.

Existem diversos tipos de prensas [6]:

- Prensas verticais. Existem duas versões. A primeira, com um macaco de rosca, em que a pressão é exercida de cima para baixo. Uma segunda versão contém um macaco hidráulico, que levanta a caixa e comprime o bagaço de baixo para cima. Com este tipo de prensa é necessário prensar entre 3 a 6

vezes, sendo que, entre cada duas delas, o revolver do bagaço é feito manualmente ou então com um esmiuçador mecânico.

- Prensas horizontais de rosca. Trabalham por rotação e aproximação de uma ou duas placas móveis. A caixa é de madeira, aço inoxidável ou plástico. A sua condução é manual ou automática. Algumas são munidas de programadores, que modificam a velocidade de prensagem, que a fazem parar quando atinge uma certa pressão pretendida, e procedem automaticamente ao revolvimento. O carregamento e o esvaziamento são fáceis de realizar. As cadeias interiores em aço asseguram o esmiuçamento.

- Prensas horizontais pneumáticas. Exercem o seu efeito pelo enchimento de uma bolsa interior em borracha espessa. A bolsa esmaga a vindima contra a caixa cilíndrica de aço inoxidável. O sumo atravessa a caixa formando peneira ou então é recolhido por drenos interiores. O enchimento efectua-se com a ajuda de um compressor de ar. O revolvimento obtém-se pela queda de pressão que liberta o bolo de bagaço prensado contra a parede da caixa e pela rotação da própria caixa.

- Prensas contínuas. São baseadas no princípio do parafuso sem fim em forma de hélice ou rosca de Arquimedes. Empurram o bagaço contra um estribo com contra-pesos, que lhe permitem formar um tamponamento espesso. As prensas contínuas modernas têm roscas de grandes diâmetros, velocidades de rotação lentas e um sistema de regulação automático de pressão. Dispõem de várias saídas de mosto, assegurando o fraccionamento segundo a qualidade.

Seja qual for o modelo de prensa, a qualidade depende mais da forma como estas são usadas. Por exemplo, o resultado será melhor se se eliminar o sumo das últimas prensagens. A procura de qualidade impõe uma selecção em todos os estágios, eliminando as uvas estragadas, os últimos mostos de prensa e os detritos de defecação.

Normalmente o melhor vinho é obtido a partir do mosto de esgotamento, ao qual se pode juntar a primeira prensagem. Nos sumos de prensa seguintes evidenciam-se as características herbáceas da casta. Para demonstrar algumas das diferenças nos constituintes dos mostos, a Tabela 1.2 mostra os resultados das análises dos mostos obtidos num ciclo de prensagem. Pode-se verificar que a acidez total vai diminuindo marcadamente com o ciclo de

prensagem, acontecendo o mesmo com o ácido tartárico. É possível verificar que há um aumento da quantidade de taninos (provenientes principalmente das graínhas) e do ferro e potássio.

Tabela 1.2 – Resultados das análises dos mostos obtidos num ciclo de prensagem [6]

Análise dos mostos obtidos num ciclo de prensagem em Champagne

4000 Kg de uvas

	Lagarada	1.ª volta	2.ª volta	Última prensagem
Volumes (l)	2050	410	205	200
Acidez total (g)	8,5	7,4	6,2	2,1
Alcalinidade das cinzas (méq)	44	48	54	131
pH	3,10	3,16	3,35	3,65
Ácido tartárico (g)	8,3	7,6	6,9	6,2
Potássio (mg)	663	664	829	1590
Taninos (mg)	24	50	90	150
Polissacarídeos (g)	1,28	1,76	2,60	3,68
Ferro (mg)	2	2	4	20

Uma forma diferente de limitar a maceração consiste em defecar o mosto, isto é, obter uma clarificação (espontânea ou induzida) antes da fermentação, separando os detritos vegetais e outras impurezas susceptíveis de transmitir maus sabores. Por exemplo, um mosto, cujo arranque da fermentação alcoólica foi impedido por uma sulfitação suficiente, é deixado em repouso 12 ou 24 horas numa cuba de decantação, sendo depois trasfegado, eliminando a borra grossa ou parte das borras ligeiras. O resultado da defecação do mosto é um vinho mais fresco, com acidez e mais ligeiro, com um aroma nítido, sendo que está mais estabilizado (menos sensível às condições exteriores) e apresenta uma cor mais pálida. Os teores dos vários elementos minerais, nomeadamente o ferro, são naturalmente baixos, apresentando as quantidades habitualmente presentes nas uvas.

Qualquer que seja a forma de separação de borras, a sulfitagem é indispensável. A defecação sulfurosa é a operação fundamental da vinificação em branco seco de forma racional, principalmente quando não se deseja a fermentação maloláctica. A sulfitação deve intervir o mais cedo possível, logo quando o mosto se separa por esgotamento ou por prensagem. No entanto é desnecessário sulfitar a vindima esmagada já que o sulfito irá fixar-se à parte sólida da vindima, não ficando no mosto.

A adição de sulfito tem como objectivo bloquear a oxidação. Não se deve esperar por ter a cuba cheia de mosto pois a oxidação já terá começado. Devem ser realizados testes com enzimas de forma a determinar qual a quantidade suficiente para neutralizar as oxidases (enzimas responsáveis pela oxidação).

O processo habitual de separação de borras é a sedimentação e trasfega, sendo que a centrifugação se apresenta como o processo mais rápido. A centrifugação é aplicada depois de um curto repouso, que permite que as impurezas abrasivas do mosto se depositem. Por outro lado é preferível a sedimentação por repouso à centrifugação pois esta última não separa convenientemente todas as borras existentes no mosto (se bem que possa centrifugar as borras e os mostos da prensagem pois são difíceis de separar por repouso).

A defecação estática (sem realizar a centrifugação) resulta melhor se for realizada em recipientes de baixa capacidade (entre 50 a 200 hectolitros), equipados com uma torneira de decantação, por onde se retira todas as borras depositadas. Durante este processo pode-se ainda clarificar o mosto, com a ajuda de clarificantes ou por filtragem. Os clarificantes mais utilizados são a gelatina, a caseína e a bentonite.

O uso de temperaturas baixas, principalmente em regiões quentes, facilita a clarificação e a separação das borras. Todo o material deve ser cuidadosamente limpo diariamente, já que pode ocorrer a contaminação por enzimas, levando a que a fermentação se inicie mais cedo do que seria desejável.

A defecação não deve ser demasiado extensa e também se deve deixar parte das borras ligeiras no mosto, já que estas constituem o alimento para as leveduras. Caso contrário, a fermentação alcoólica pode parar mais cedo do

que seria desejável. No mosto entretanto defecado, realizam-se análises para determinar o grau provável e a acidez do vinho, tendo em vista as correcções a realizar (que são também efectuadas no mosto): adição de açúcar (que é actualmente proibida), acidificação ou desacidificação. Depois destes procedimentos, vem a parte da fermentação alcoólica propriamente dita.

Um dos principais cuidados a ter na vinificação em branco é o oxigénio e os fenómenos de oxidação que origina. Ele desnatura o aroma, destrói o frutado e escurece a cor de um vinho branco. No entanto, é impossível eliminar o contacto do vinho com o oxigénio durante todas as operações necessárias e também não o é de todo desejável, já que as leveduras necessitam dele para sobreviver. As oxidações durante a vinificação são as mais graves porque o mosto é muito mais sensível do que o vinho, sendo também mais difícil de proteger. A oxidação das substâncias fenólicas provoca modificações intensas da cor e a formação de substâncias acres e amargas. Outros componentes do mosto são também oxidados, particularmente as substâncias do aroma.

Uma forma de lutar contra as oxidações durante a vinificação é o emprego de sulfito em doses suficientes e executar rapidamente as operações em mosto, o que vai limitar a quantidade de oxigénio dissolvida. O sulfito age, por um lado, pelas suas propriedades antioxidantes (contra as enzimas responsáveis pela oxidação – oxidases), e por outro lado, pelas suas propriedades redutoras. Daí o seu emprego ser indispensável na vinificação, especialmente no caso das vindimas que contêm uma certa proporção de uvas apodrecidas ou alteradas. Outras técnicas para prevenir as oxidações têm sido tentadas, mas a sulfitagem tem dado resultados mais seguros. Essas técnicas são, entre outras, a adição de ácido ascórbico, o aquecimento das uvas ou do mosto para destruir as oxidases, o emprego de atmosferas de dióxido de carbono nas operações de esmagamento e prensagem e o tratamento prévio dos mostos com caseína, por exemplo.

Um factor muito importante da vinificação de uvas brancas (ainda mais do que na vinificação em tinto) é a temperatura a que decorre a fermentação alcoólica. Os vinhos de maior qualidade são geralmente obtidos a temperaturas não superiores a 20° C. Se a vinificação for realizada a uma temperatura elevada (próxima ou superior a 30° C), além do inevitável risco da paragem precoce da fermentação causada pela morte das leveduras, perdem-se

consideravelmente os aromas primários e relativamente aos aromas secundários, estão são mais ricos em álcoois superiores e não em ésteres, o que se torna menos agradável ao consumidor.

Com a evolução das produções, passou-se dos cascos de madeira de pequena capacidade para cubas de grande capacidade. Esta transição acentuou a atenção no controlo da temperatura.

No caso da fermentação em cascos, os barris têm, habitualmente, capacidades próximas dos 200 litros e devem ser colocados num local temperado, com temperatura inferior a 20º C, e constituem as melhores condições para o desenvolvimento das leveduras. Após os primeiros dias de fermentação mais ou menos tumultuosa, esta decorre à temperatura ambiente. O maior risco será mesmo a temperatura tornar-se demasiado baixa e existir a necessidade de aquecer o local, de forma a não parar a fermentação. O arejamento neste tipo de fermentação é suficiente, utilizando o orifício do batoque. Os cascos não são completamente cheios de forma a não deixar sair a espuma que se forma com a fermentação. Quando a fermentação deixa de ser tumultuosa, convém que se comece a atestar a vasilha. Outra vantagem que tem a fermentação em cascos de madeira é a clarificação rápida e espontânea das leveduras. Por outro lado, apresenta alguns inconvenientes como o grande trabalho manual que envolve o controlo do atesto e da trasfega por casco, as irregularidades de casco para casco no que respeita à constituição do mosto e à evolução das fermentações, o risco da contaminação por leveduras e, a longo prazo, um risco de perda de frescura e de frutado e envelhecimento acelerado.

Relativamente à fermentação em cubas, as de betão têm sido frequente e progressivamente substituídas por cubas metálicas, que oferecem vantagens na adaptação à regulação de temperatura. Neste tipo de vasilhas de cimento, o controlo de temperatura é bastante mais difícil, sendo que o objectivo de temperaturas inferiores a 20º C é praticamente impossível de atingir, tendo sido substituído pelo objectivo de temperaturas inferiores a 30º C. Já nas modernas cubas metálicas o mosto é arrefecido por rega das paredes exteriores, permitindo, este tipo de cuba, o arrefecimento por vaporização e evaporação, podendo a temperatura em cubas de 1000 hectolitros ser, aproximadamente, 19º C.

O fim da fermentação é determinado pela ausência de açúcares. É feita uma determinação do teor em açúcares redutores. O tratamento que se segue depende da opção que é feita relativamente à fermentação maloláctica. Quando se procura essa fermentação, e se evitou anteriormente a sulfitação forte do mosto e uma defecação demasiado extensa, deixa-se então o vinho até que desapareça o ácido málico. Se, pelo contrário, se quer evitar a fermentação maloláctica, faz-se imediatamente a trasfega e uma nova sulfitação. A fermentação maloláctica consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico, limitando a acidez fixa dos vinhos e produzindo dióxido de carbono, que dá origem ao característico "pico" ou "agulha" dos Vinhos Verdes.

No entanto, apesar de amaciar os vinhos, a ocorrência da fermentação maloláctica tem os seus custos, provocando uma diminuição dos aromas primários, sendo essa a razão pela qual muitos enólogos evitam a sua ocorrência nos vinhos brancos, que devem ser simultaneamente frescos e aromáticos.

A partir deste passo, todos os processos a realizar visam a conservação do vinho e o seu correcto envelhecimento. De referir também o tratamento pelo frio a que o vinho deverá ser sujeito, de forma a eliminar o excesso de ácido tartárico, cuja precipitação, quando engarrafado, é muito frequente em vinhos brancos.

1.3.4 As análises de rotina em vinhos e durante a sua produção [8,9]

A análise de vinhos e de vários tipos de amostras, desde a uva até à obtenção do produto final, é um processo de rotina nas empresas de hoje. A partir destas análises tenta-se prever qual a melhor altura para fazer a vindima, controla-se a produção de um vinho, procede-se à correcção de algum desequilíbrio num constituinte do mosto ou vinho, faz-se o controlo de qualidade de um vinho ou avalia-se a salubridade do produto. Todos estes passos são importantes e por isso uma empresa deve ter um laboratório de análise, assim como qualquer viticultor deve ter o seu pequeno laboratório para que possa avaliar como decorre a vinificação.

Esta secção serve para elucidar a importância das determinações feitas em vinhos e enumerar alguns dos constituintes que devem ser sujeitos a análises.

Mesmo quando ainda temos apenas as uvas nas videiras, algumas determinações devem ser feitas para avaliar a maturação do fruto e determinar qual a melhor altura para fazer a vindima. É sabido que a vindima deve ser efectuada quando os frutos estão maduros e não no estado verde ou já demasiado maduro. É com as uvas colhidas que depois se produz o vinho pelo que importa que estejam nas melhores condições possíveis. Portanto, determinar qual a altura ideal para a vindima é bastante importante. Outro aspecto que realça a importância destas determinações é o conhecimento da composição do mosto que será produzido a partir das uvas. Esse conhecimento antecipado levará a que se possa planear correctamente as eventuais correcções no mosto. Os três elementos que devem ser considerados são os açúcares, os ácidos e as matérias corantes. Consoante o tipo de terreno e o tipo de vinho desejado, é preciso encontrar o equilíbrio entre os ácidos e os aromas, com a maior riqueza possível em açúcares.

Já relativamente aos mostos e vinhos, as análises físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais tornaram-se fundamentais para a indústria vínica. Com estes processos tenta-se aumentar a qualidade do produto, reduzir os desperdícios e conservar o vinho por um período de tempo mais extenso. As análises são realizadas desde o esmagamento e prensagem da uva, durante toda a fermentação e todos os processos subsequentes até ao engarrafamento, e mesmo depois, durante o envelhecimento do vinho. Os propósitos da realização das análises são diversos. Podem ter o intuito de detectar falsificações ou fraudes, detectar a presença de produtos proibidos, determinar quantidades de alguns componentes de forma a verificar se estão dentro do regime legal imposto ou então para que se possa efectuar uma correcção e, finalmente, para avaliar a qualidade geral do vinho.

Certas falsificações ou fraudes podem ser detectadas através da aplicação de métodos estatísticos às determinações de metais raros no vinho (que estão presentes em quantidades sempre muito pequenas), que pode indicar a utilização de uvas ou vinho de regiões exteriores à região demarcada, por exemplo, ou então através da determinação das razões de alguns constituintes, que podem indicar o uso indevido de água, açúcar ou álcool. Relativamente aos produtos proibidos, é bastante frequente a determinação do metanol.

Diversos constituintes, tais como o etanol, o dióxido de enxofre ou a acidez volátil, estão sujeitos a um controlo legal e portanto, as respectivas determinações são bastante frequentes. Já a componente ácida de um vinho pode ser alvo de correcções durante a vinificação (tanto para acidificar como para desacidificar), pelo que as determinações dos constituintes ácidos têm de ser realizadas para detectar qualquer desequilíbrio. Outro componente que pode ser também alvo de correcções é o açúcar do vinho (sacarose).

Finalmente, a qualidade geral de um vinho é avaliada por análises dos quatro tipos acima referidos: físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais. Isto porque o conceito "qualidade" envolve diferentes aspectos, tais como o aspecto visual do vinho, o paladar, o aroma ou até relativamente à capacidade de conservação e envelhecimento durante um longo período de tempo.

A determinação de pesticidas em vinhos, assim como noutro tipo de produtos alimentares, enquadra-se na avaliação da presença de produtos proibidos. A sua proibição deve-se à suposição ou comprovação da toxicidade deste tipo de produtos para a saúde dos seres vivos. Os pesticidas devem ser sempre encarados como "culpados" até que se possa provar a sua "inocência", e portanto, a proibição de qualquer pesticida novo deve ser efectuada de forma mecânica. Assim, a avaliação das quantidades de pesticidas existentes num produto alimentar deverá ser feita para que o consumidor seja protegido. Para isso existem limites legais estabelecidos para os pesticidas. Eles vão variando consoante os produtos alimentares em questão. Por outro lado, a aplicação dos pesticidas nas culturas está sujeita a medidas preventivas para que não permaneçam nos produtos alimentares até ao momento de estes serem consumidos.

A discussão sobre mais aspectos relacionados com pesticidas será feita no Capítulo 2.

A selecção do método analítico mais adequado não é sempre fácil. Deve-se optar por um método simples e insensível ou por um método mais lento e mais exacto?

Pelo menos dois princípios são importantes para a resposta à questão. O primeiro refere-se ao grau de exactidão que se pretende. Para muitos dos controlos de rotina que existem numa produção vinícola, um método relativamente inexacto é adequado, servindo o resultado fundamentalmente

como um guia. Por exemplo, a quantidade de dióxido de enxofre livre num vinho de mesa branco durante o envelhecimento não precisa de ser conhecido senão de uma forma aproximada. Por outro lado, aquando do engarrafamento, é necessária uma determinação mais exacta. Para fins de pesquisa e investigação, os métodos necessários devem ser ainda mais exactos e também precisos.

O segundo princípio refere-se ao número de análises que se pretende realizar. Num grande laboratório, em que se realizam centenas de determinações de ferro e de cobre por ano, por exemplo, será preferível utilizar um método de larga escala, como por exemplo a espectrofotometria de absorção atómica, em que existe ainda a possibilidade de utilizar uma versão automatizada deste equipamento. Por outro lado, num laboratório que realiza apenas um punhado de análises por ano, de um determinado componente, deve-se escolher outro tipo de procedimento, mesmo que requeira mais tempo para se realizar, já que não se justificaria o investimento nem os custos de utilização e manutenção dos aparelhos de larga escala.

Um laboratório que tem de realizar 10 ou 20 determinações de etanol em cada dia de trabalho deve escolher procedimentos e equipamentos diferentes dos utilizados num laboratório que realiza apenas algumas determinações por semana, por mês ou em apenas 2 ou 3 ocasiões por ano. É possível que, em pequenas adegas/companhias vinícolas, apenas algumas determinações químicas essenciais sejam efectuadas. Provavelmente será mais rápido e económico efectuar as determinações mais complicadas em laboratórios "comerciais". Nos trabalhos de investigação, diferenças muito pequenas entre constituintes podem ser muito importantes. Obviamente que os métodos mais exactos devem ser utilizados neste tipo de trabalho mas este tipo de método analítico não é normalmente apropriado para as análises de rotina na indústria vinícola. Os métodos mais exactos são referidos normalmente como métodos de referência, em contraste com os métodos de rotina.

Outro aspecto muito importante é o limite de detecção, e também o de determinação, de um método analítico. Não é importante ter um método de determinação de ácido tartárico em vinhos que tenha resultados válidos até às microgramas de ácido tartárico por litro de vinho, quando a medição necessita apenas de ser feita até aos miligramas por litro, sem que o interesse para a

indústria não seja de alguma forma correspondido. Utilizando um exemplo que tem mais a ver com o trabalho desenvolvido, o limite máximo de resíduos para o pesticida Diclofluanida, em uvas, estabelecido em Portugal pela portaria 488/90 de 29-06-1990 é de 10 ppm [14] (miligramas de pesticida por quilograma de uva). Ora, para efectuar este tipo de determinações não deve ser usado um método com limite de determinação na ordem dos ppb (microgramas por quilograma), já que um método com um limite na ordem de 1 ppm seria suficiente para garantir que o produto respeitava a lei. Por isso, os limites de detecção do método e de determinação são factores importantes para a escolha de um método analítico para se implementar num laboratório.

Os métodos analíticos utilizados nos laboratórios de uma empresa vitivinícola não são necessariamente baseados em doseamentos por titulação ou gravimetrias, apesar de serem os mais utilizados em termos de análises de rotina. De seguida enumeram-se algumas técnicas que são utilizadas em análises de vinhos e a mostos:

- Extracção
- Evaporação
- Destilação
- Permuta iónica
- Espectrofotometria
- Turbidimetria
- Espectrometria de absorção atómica
- Cromatografia (líquida, gasosa e iónica)
- Eléctrodos selectivos de iões
- Complexometria
- Análise enzimática.

1.3.5 A região dos Vinhos Verdes e a Quinta de Azevedo [2,3]

A actual Região Demarcada dos Vinhos Verdes estende-se por todo o noroeste do país, na zona tradicionalmente conhecida como Entre Douro e Minho. Tem como limites a norte o rio Minho (fronteira com a Galiza), a nascente e a sul zonas montanhosas que constituem a separação natural entre

o Entre Douro e Minho atlântico e as zonas do país mais interiores de características mais mediterrânicas, e por último o Oceano Atlântico que constitui o seu limite a poente.

Ortograficamente, a região apresenta-se como um anfiteatro que, da orla marítima, se eleva gradualmente para o interior, expondo toda a zona à influência do oceano Atlântico, fenómeno reforçado pela orientação dos vales dos principais rios, que correndo de nascente para poente facilitam a penetração dos ventos marítimos.

A maior parte da região assenta em formações graníticas, constituindo excepções duas estreitas faixas que a atravessam no sentido NW-SE, uma onde aparecem formações carboníferas e de lousa, e outra de xistos.

O solo tem, na maior parte da região, origem na desagregação do granito. Caracteriza-se, em geral, por apresentar pouca profundidade, texturas predominantemente arenosas a franco-arenosas (ligeiras), acidez naturalmente elevada e pobreza em fósforo.

Os níveis de fertilidade são naturalmente baixos, como facilmente se depreende das características apontadas acima. No entanto, dada a natureza dos sistemas agrários praticados desde tempos recuados na região, os solos apresentam uma fertilidade adquirida considerável, que permitiu durante séculos suportar as mais altas densidades populacionais do país. O segredo desta fertilidade pode resumir-se a dois principais tipos de intervenções do homem nas condições naturais: o controlo do relevo pela construção de socalcos e as incorporações intensivas e persistentes de matéria orgânica no solo.

O clima da região é fortemente condicionado pelas características orográficas e pela organização da rede fluvial referida atrás. O aspecto mais marcante é o regime anual de chuvas, que se caracteriza por totais anuais bastante elevados, em média 1500 mm, e uma distribuição irregular ao longo do ano, concentrada no Inverno e na Primavera.

Por outro lado, a temperatura do ar evolui ao longo do ano em simetria com a precipitação. Isto é, as temperaturas mais altas coincidem, durante o ano, com as precipitações mais baixas (final da Primavera e Verão quentes e secos) e as temperaturas mais baixas com as precipitações mais altas (Invernos frios e chuvosos).

Relativamente à temperatura média anual e às médias das máximas e médias das mínimas, pode dizer-se que não são excessivas, o que traduz um regime de clima ameno.

Quanto ao relevo, a região apresenta-se com uma topografia bastante irregular, sendo recortada por uma densa rede de vales associada à já referida rede fluvial, aspecto que se acentua do litoral para o interior.

A Quinta de Azevedo, onde se processou o trabalho de campo, foi adquirida pelo Grupo Sogrape em 1980. A sua compra deu seguimento a uma política de promoção da qualidade dos vinhos produzidos e das castas nobres portuguesas. Situa-se na região central dos vinhos verdes, perto da cidade de Barcelos, e garante o fornecimento de uvas de excepcional qualidade.

A região dos Vinhos Verdes é constituída por solos de origem granítica, ácidos, geralmente pobres em elementos como o Fósforo e o Potássio. Os solos da Quinta de Azevedo são, no entanto, mais argilosos, proporcionando melhor retenção de águas, fundamental no período de maturação da uva.

O Noroeste de Portugal é uma região dominada pela influência do Atlântico. A temperatura não apresenta valores extremos, nem no Inverno nem no Verão o que resulta num clima ameno de Invernos não muito frios e com pluviosidade elevada e Verões relativamente secos e frescos. A Quinta de Azevedo é também naturalmente sujeita a este clima o que, aliado ao solo, vai definir o tipo de vinho aí produzido.

No projecto da Quinta de Azevedo para a produção de Vinho Verde de Denominação de Origem Controlada, foram considerados dois aspectos fundamentais:

- A instalação da vinha seguindo os processos de condução da videira mais indicados para a produção de vinhos de qualidade e de acordo com a configuração do terreno, utilizando castas nobres da região;
- A construção de uma adega moderna com equipamento adequado para a produção de vinhos brancos de alta qualidade.

Quanto à sua dimensão, devemos considerar a área envolvente ao Solar normalmente designada por Azevedo e a Quinta da Covilhã, propriedade que fica separada de Azevedo pela rua no seu lado nascente, ocupando, as duas quintas, uma área total de 40 hectares. A área de vinha instalada em Azevedo

é de 22 hectares. A área de vinha instalada na Quinta da Covilhã é de 9 hectares.

São conhecidos na região dos Vinhos Verdes vários sistemas de condução. As Uveiras, a forma de instalação de vinha mais famosa e ancestral, conhecida também por vinha de enforcado, que bordejavam os campos de cultivo, e as Ramadas ou Latadas, que são estruturas horizontais que se vêm com frequência sobre os caminhos ou na orla dos campos.

Estes sistemas de condução obrigam a trabalhos como a poda e a vindima, morosos, lentos e mesmo perigosos e a tratamentos fitossanitários frequentes pela grande expansão vegetativa que criam, propícios a doenças com o Oídio e o Míldio. Com a procura de vinhos brancos de qualidade, passaram a ser utilizados sistemas de condução mais modernos como a Cruzeta e o Cordão.

Na Quinta de Azevedo foi adoptado o sistema de condução em Cordão, neste caso de cordão simples em que a videira é conduzida a uma altura de 1,70 m onde se situa a zona vegetativa e produtiva, orientada naturalmente para baixo do arame de suporte. Há dois pés de videira por poste, que se dirigem no arame em sentidos opostos, percorrendo cada um 1,50 m, com uma carga de 25 a 30 olhos originando um rendimento médio de 8500 kg/ha. A distância entre pés de videira (entre postes) é de 3 m na linha e a distância entre linhas é também de 3 m.

Com este sistema diminuem-se substancialmente os problemas do ponto de vista técnico, uma vez que os tratamentos à vinha são facilitados, há melhor exposição e arejamento minimizando-se as doenças e conseguindo-se maturações mais equilibradas.

Na entrelinha mantém-se um enrelvamento permanente de trevo e azevem, para a protecção do solo e para facilitar a passagem das máquinas enquanto que ao longo das linhas de vinha o controlo das infestantes é assegurado pela aplicação de herbicidas.

Em Azevedo, como em geral em toda a região dos Vinhos Verdes, usa-se o porta-enxerto normalmente utilizado é designado por SO4. Sendo um solo de drenagem difícil, o SO4 adapta-se bem pelo seu sistema radicular fasciculado e superficial. É um porta-enxerto produtivo adaptando-se às grandes expressões vegetativas e sendo precoce, antecipa a maturação.

Na procura de qualidade para a produção dos vinhos da Quinta de Azevedo, foi escolhida a casta Loureiro, pelas suas qualidades aromáticas sendo o seu habitat mais favorável situado precisamente entre os rios Lima e Cávado. Na parcela de Azevedo, a casta predominante é Loureiro (95%), sendo os restantes 5% distribuídos por Trajadura (3%), Pedernã (1,5%) e Azal (0,5%). Na Quinta da Covilhã foi plantada a casta Pedernã, casta que combina com o Loureiro trazendo frescura ao lote pela sua acidez natural, ajudando a uma melhor caracterização e longevidade ao vinho produzido sob o nome de Quinta de Azevedo. A Pedernã ocupa 97% do encepamento nesta parcela da quinta sendo o restante preenchido com a casta Loureiro.

O lote final do vinho verde Quinta de Azevedo é feito com 70% Loureiro e 30% de casta Pedernã. O Loureiro dá todo o carácter, aroma e personalidade ao vinho, enquanto que a Pedernã, pela sua acidez, vai dar toda a frescura desejável para o Vinho Verde.

Um dos inconvenientes dos sistemas de condução antigos como as Ramadas e sistemas de Enforcado, devido às grandes expansões vegetativas, era o atraso e mesmo insuficientes maturações deixando as vindimas para finais de Setembro e mês de Outubro, havendo a possibilidade de ocorrência de chuvas e consequentemente muito podre nas uvas.

Com o sistema de condução utilizado na Quinta de Azevedo, consegue-se que se atinjam os pontos de maturação desejados para o tipo de vinho que se pretende fazer antes da época das chuvas, com um grau alcoólico entre 10 e 11° e acidez mais baixa que o tradicional na região.

A data de vindima é determinada através do estudo de maturação e registos de acidez, grau alcoólico provável e de prova organoléptica do bago da uva, de forma a obter o ponto óptimo de aroma da casta. Cada casta tem o seu ponto de equilíbrio sendo a casta Loureiro vindimada primeiro e duas semanas depois a casta Pedernã. A vindima é feita durante o mês de Setembro e tem normalmente um período de laboração de 3 semanas.

Se repararmos na localização da adega na Quinta de Azevedo face à disposição das vinhas (Figura 1.13), verificamos que ela ocupa uma posição central, o que vai optimizar o tempo de transporte entre a vinha e a adega permitindo que as uvas cheguem à adega em perfeitas condições.

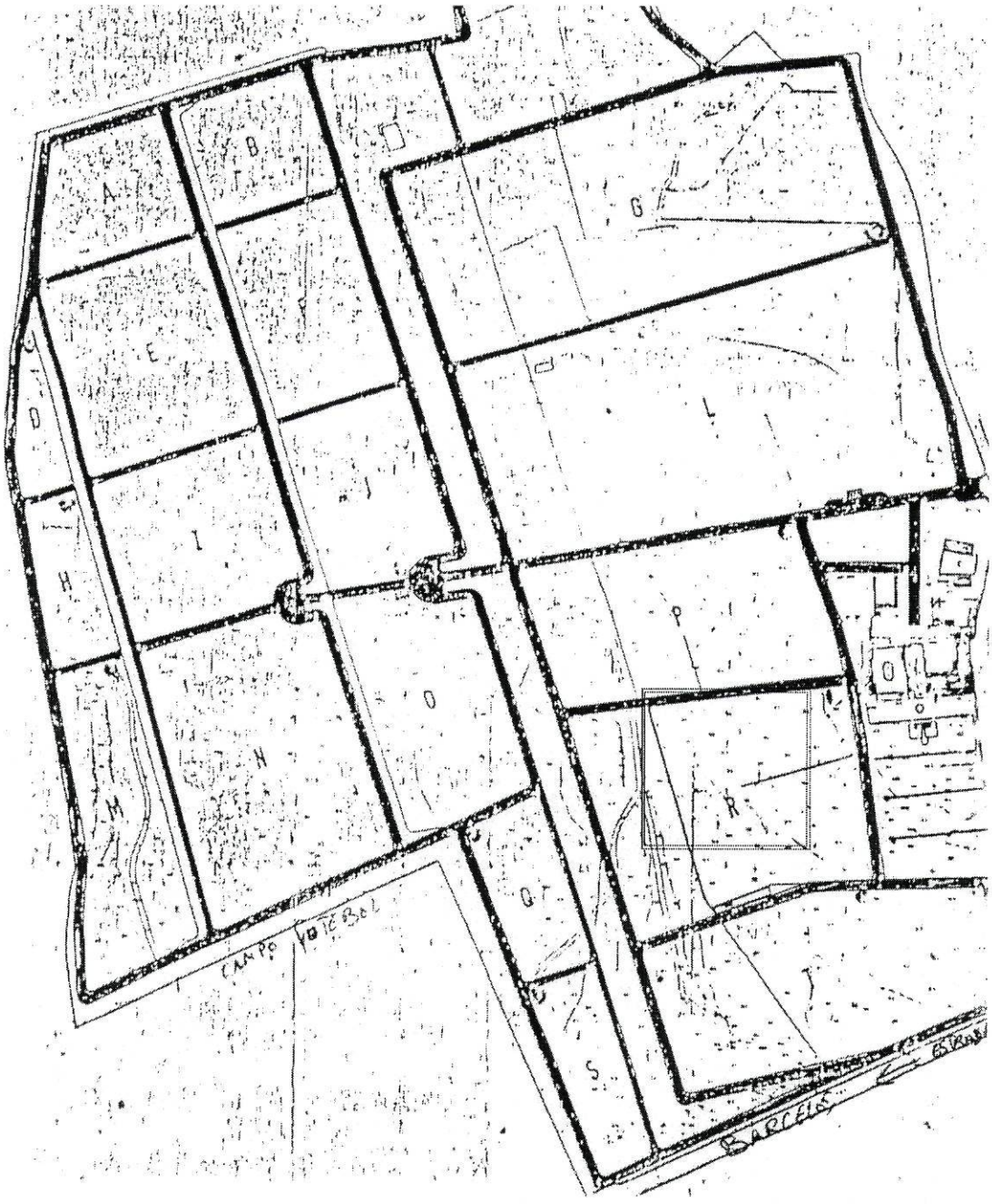


Figura 1.13 – Mapa da Quinta de Azevedo

O material da adega é feito de aço inox, garantindo assim toda a limpeza e higiene no processo produtivo, o seu equipamento é o adequado à vinificação de vinho branco de qualidade com uma capacidade de vinificação de 850000 litros.

As uvas são transportadas da vinha em tinas com uma carga nunca superior a 800 kg. A recepção das uvas é feita no tegão que através de um sem-fim,

conduz as uvas a um esmagador. Da casta Loureiro, faz-se uma selecção das melhores uvas, que são desengaçadas e conduzidas para cubas (existem duas cubas de 20000 litros de capacidade) onde, durante um período de 12 a 18 horas, se faz uma maceração pelicular para uma melhor extracção aromática através da película, a uma temperatura de 14º C. As massas são dirigidas depois para a prensa.

Todas as outras uvas passam só pelo esmagador e são dirigidas directamente à prensa. Na passagem do esmagador para a prensa (ou para a cuba de maceração pelicular) as massas vínicas recebem sulfito que funciona como anti-séptico e antioxidante.

Esta prensa é uma prensa horizontal, de pratos, com uma capacidade para 7000 kg de uva esmagada (Figura 1.14). A utilização desta prensa foi a opção tecnológica escolhida pois permite uma boa prensagem e ao mesmo tempo uma excelente extracção de aromas varietais.

Utiliza-se a primeira e a segunda prensagem para todos os vinhos, sendo os restantes apertos fermentados à parte, obtendo-se um vinho de prensa que é vendido para destilação.

Na adega existem 2 tanques de 11500 litros e 6 de 20500 litros. A clarificação do mosto é feita nestes tanques por um período de tempo entre 24 a 48 horas, a uma temperatura de 10º C até se obter a limpidez desejada. São adicionadas também enzimas pectolíticas que ajudam na clarificação e aceleração desta operação.

A fermentação alcoólica faz-se em tanques no exterior da Adega com as seguintes capacidades: 2 tanques de 20500 litros e 20 tanques de 41000 litros (Figura 1.15).

As temperaturas de fermentação variam entre os 14 e 17º C, sendo as temperaturas mais elevadas utilizadas na casta Loureiro e as mais baixas na casta Pedernã. Na fermentação de todo o mosto é utilizada a levedura QA23.

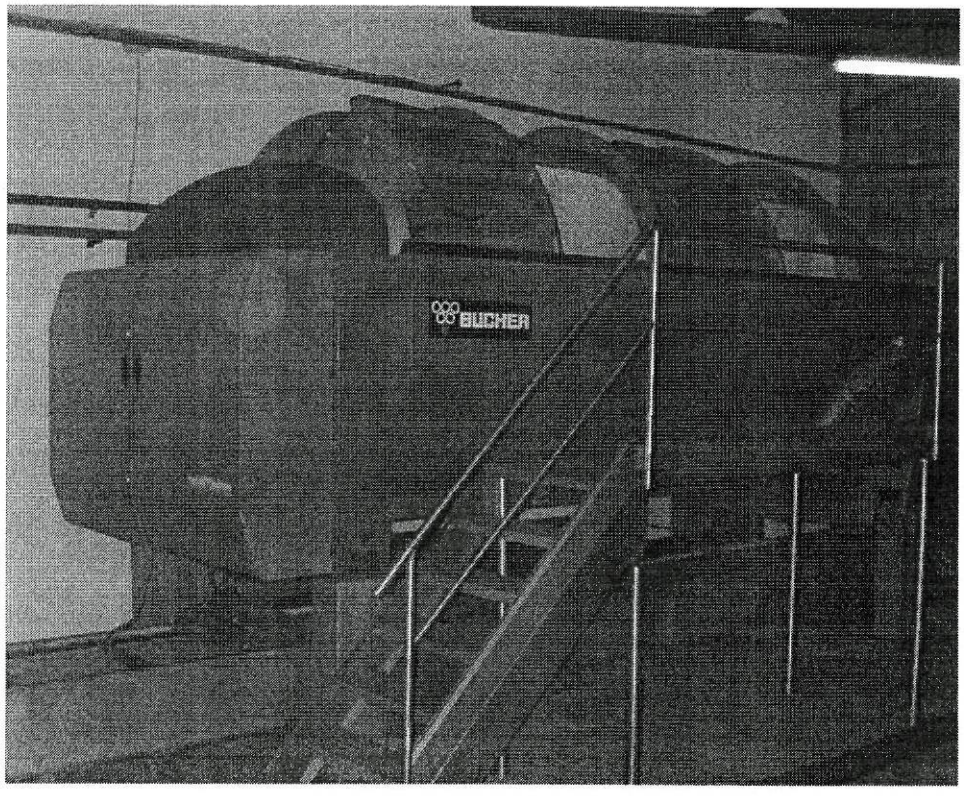


Figura 1.14 – Prensa utilizada em Azevedo

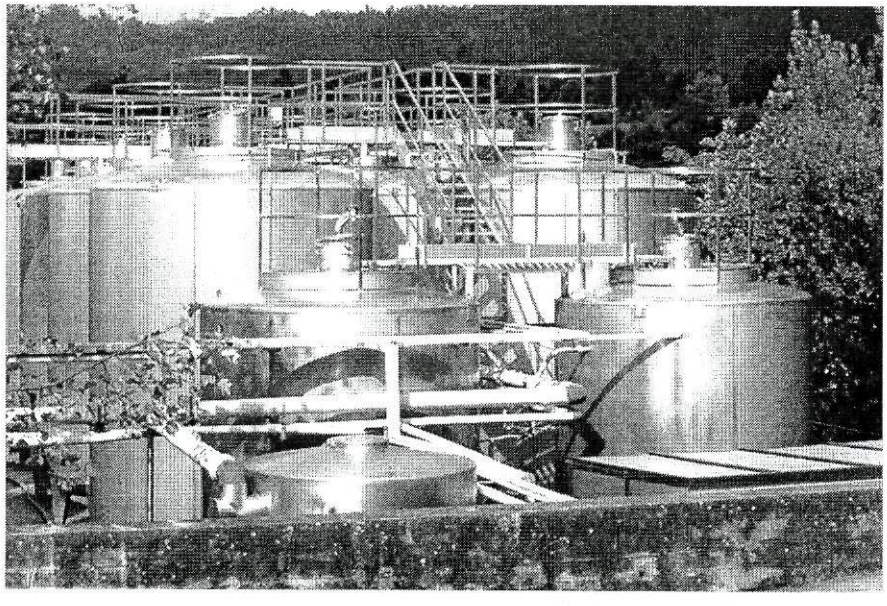


Figura 1.15 – Tanques de fermentação alcoólica

Após a fermentação alcoólica, os vinhos são trasfegados e separados das borras grosseiras para outros tanques estagiando os vinhos nas borras finas. Estas borras ajudam à complexidade do vinho, funcionando ao mesmo tempo como anti-oxidante. Nesta fase da operação, os vinhos são corrigidos com sulfito estabilizando em 35 mg/litro de SO_2 livre.

A colagem por bentonite é essencial para a clarificação do vinho e sua estabilização proteica, utilizando-se somente a dose mínima necessária. A caseína ou gelatina contribuem sobretudo para o afinamento das suas características organolépticas. Estas colas reagem com certos compostos do vinho formando flóculos que em seguida precipitam no fundo da cuba.

Capítulo 2 – Pesticidas

Índice

CAPÍTULO 2 – PESTICIDAS 67

2.1 – INTRODUÇÃO 68

2.2 - OS PESTICIDAS E O MEIO AGRÍCOLA 69

2.3 O caso do DDT *70*

2.4 - FILOSOFIAS DE APLICAÇÃO DE PESTICIDAS 81

2.5 DEGRADAÇÃO DOS PESTICIDAS 89

2.6 OS PESTICIDAS UTILIZADOS NO ESTUDO 90

2.1 – Introdução

Neste capítulo explica-se a utilização de pesticidas no meio agrícola de uma forma geral, focando depois a atenção nos pesticidas que são utilizados de uma forma mais corrente na vinha.

Em seguida é feita uma descrição sobre as filosofias de aplicação de pesticidas, nomeadamente a utilização intensiva e dominada pelo aspecto tempo, isto é, que respeita as indicações sobre as épocas em que certas pragas atacam geralmente as culturas, a introdução das práticas decorrentes da Revolução Verde, dominada pela produção em larga escala, e a Protecção Integrada, dominada pela vontade de produzir com aplicações mínimas de produtos químicos.

Finalmente, relatam-se algumas informações importantes sobre os pesticidas que foram incluídos neste estudo.

2.2 - Os pesticidas e o meio agrícola [4,10]

Pesticida é um termo que se refere a um agente químico, físico ou biológico que mata organismos que são classificados como pestes, tais como insectos, roedores ou fungos. O termo inclui fungicidas, insecticidas e agentes capazes de combater outras doenças provocadas por organismos, tais como as bactérias. Em muitos casos, também os herbicidas (agentes que matam plantas) são incluídos nesta designação.

Todos os anos, cerca de 30 a 48% da produção mundial de alimento é destruída ou consumida por pragas. Nesta designação incluem-se insectos, mamíferos, aves, bactérias, fungos, vírus e ervas daninhas. As maiores perdas ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, onde os agricultores muitas vezes produzem mais que uma colheita por ano no mesmo campo de cultivo, o que pode permitir um grande aumento populacional das pragas. Acresce ainda o facto de os Invernos nestas regiões não serem rigorosos, não sendo portanto um factor que limite o número de espécimes que sobrevive a essa estação. Mesmo nos países mais avançados tecnologicamente, cerca de 40% da

produção é perdida por causa da acção das mais diversas pestes, apesar do dispêndio de enormes quantias para o controlo dessas pragas. Num planeta em que existe tanta fome, desertificação de solos e outros problemas provocados pela cultura intensiva de alimentos, perdas desta magnitude colocam sérios problemas.

A necessidade de proteger as colheitas de ataques de pragas vem desde os tempos em que o Homem iniciou o cultivo do solo. Inicialmente porque necessitava do alimento, e mais recentemente por razões puramente económicas. Nesse sentido, começou a procurar substâncias e práticas agrícolas que minimizassem ou até eliminassem os danos causados por essas pragas. Assim que a agricultura passou a ser uma prática intensiva, visando a busca do lucro, a procura desses produtos intensificou-se. Na segunda metade do século XX deu-se a grande explosão da utilização de pesticidas na agricultura. A descoberta dos pesticidas organoclorados trouxe riqueza, por terem custos de produção relativamente baixos que permitiu a sua utilização em massa, sem pensar nas consequências ambientais.

Também a introdução de novas filosofias de cultivo trouxeram diferentes visões sobre a aplicação de pesticidas. Assim, a chamada Revolução Verde, ou Green Revolution, iniciada em 1944 no México, trouxe novas políticas agrícolas, que visavam a produção intensiva de alimentos, sem olhar a meios. Uma das vertentes dessa filosofia era a aplicação de grandes quantidades de produtos químicos de forma a não permitir a intervenção das pragas nas culturas. No entanto, de outras práticas culturais desta filosofia resultou um acréscimo de ataques das pestes, nomeadamente, o cultivo de campos sem rotação, utilização intensiva de fertilizantes e da rega, e alguma vulnerabilidade de algumas espécies introduzidas pela Revolução Verde às pragas de cada local.

2.3 O caso do DDT [10]

Desde a Segunda Guerra Mundial que os produtos químicos têm sido a forma mais usada de controlo de pragas. Esta é uma generalização, havendo também outro tipo de práticas que continuam a ser usadas, tais como as

queimadas que são visíveis em muitos locais. A primeira geração de pesticidas era composta principalmente por produtos altamente tóxicos, como o arsénico e o cianeto. O seu uso foi abandonado porque ou eram ineficientes ou então demasiado tóxicos. A segunda geração de pesticidas incluía compostos orgânicos sintéticos: o primeiro pesticida orgânico sintético importante foi um organoclorado: o DDT. O DDT foi descoberto em 1939 pelo Químico suíço Paul Muller e foi considerado um milagre por várias razões:

- Era tóxico para um grande grupo de pragas de insectos, apesar de parecer ter baixa toxicidade para os mamíferos;
- Era persistente, isto é, não se degradava rapidamente no meio ambiente, o que significava que não tinha de ser aplicado muitas vezes;
- Não era solúvel em água e por isso não era arrastado pelas chuvas;
- Era pouco dispendioso e de fácil aplicação.

Era tão eficiente no combate às pestes, aumentando o rendimento dos campos de cultivo, e económico que o seu uso se espalhou rapidamente por todo o mundo. Em 1944, Muller recebeu o Prémio Nobel pela sua descoberta. O DDT era também usado para aplicações não agrícolas, por exemplo, foi usado durante a 2ª Guerra Mundial para despiolhar os soldados, e até aos anos 60, para controlar a população de mosquitos nas zonas residenciais dos Estados Unidos da América, usando camiões que percorriam as ruas das cidades espalhando o produto, criando uma névoa por onde passavam, onde, por vezes, as crianças iam brincar.

A magia do DDT parecia que se espalhava cada vez mais. O rendimento de cultivo aumentava para as culturas tratadas, doenças como a malária ficaram sob controlo... Tudo parecia que estava a correr às mil maravilhas – as pessoas podiam de uma forma acessível e barata controlar imensas pestes que lhes prejudicavam a qualidade de vida.

Depois, o entusiasmo pelos pesticidas começou a arrefecer. Entre variados factores esteve a publicação do Livro "Silent Spring" (Primavera Silenciosa) de Rachel Carson, publicado em 1962 e que foi um best-seller. A autora, cientista de profissão, fez avisos muito sérios sobre os pesticidas e previu a destruição em massa dos frágeis ecossistemas do planeta se nada fosse feito para travar o que ela chamou de chuva de produtos químicos ("rain of chemicals"). Olhando em retrospectiva, o livro foi um precursor do movimento ambientalista.

Tinha intenção de focar os hidrocarbonetos clorados, como o DDT, e apontava indícios que os ligava à morte de criaturas que não se pretendia afectar pelos pesticidas, tais como aves. Referia também que essas mortes ocorriam via duas formas principais:

Toxicidade directa: foi descoberto que o DDT era tóxico para peixes e caranguejos, e não apenas para insectos;

Toxicidade indirecta, relacionada com a sua persistência. A persistência advinha em parte devido à insolubilidade dos pesticidas e pelo facto de serem compostos sintéticos, e por isso novos no meio ambiente, não havendo microorganismos capazes de degradar estes produtos.

A autora mostrou também que insectos e aves que se alimentam de vermes estavam a morrer em áreas onde os pesticidas tinham sido aplicados através da utilização de pequenos aviões.

Os produtores de pesticidas afirmaram que as pequenas quantidades de pesticidas encontradas no ambiente não seriam suficientes para provocar a morte destes seres. No entanto, algum trabalho experimental demonstrou que até pequenas quantidades de alguns pesticidas pode afectar a sobrevivência e a reprodução de algumas espécies. Ainda mais importante, pesquisas demonstraram que, apesar das concentrações serem muito pequenas no solo, atmosfera ou na água, as concentrações eram muito mais elevadas nas plantas, ainda maiores em herbívoros e sempre a aumentar até ao topo da cadeia alimentar.

A toxicidade indirecta estava então relacionada com dois princípios:

(1) Bioconcentração – tendência de um composto para acumular nos tecidos de um organismo (especialmente em tecidos de gordura nos casos de organoclorados solúveis em lípidos como o DDT):

(2) Bioampliação – o aumento da concentração em direcção ao topo da cadeia alimentar.

Devido ao facto do DDT ser persistente, existe uma grande oportunidade para que ele seja retirado do ambiente pelos organismos. Por exemplo, no ecossistema estuarino junto a Long Island, EUA, foram encontradas as seguintes concentrações de DDT:

- Na água: 3 ppt
- No zooplâncton: 0,04 ppm

- Em Vairões (pequeno peixe de água doce): 0,5 ppm
- Em peixes de grande porte: 2,0 ppm
- Em Águias-pesqueiras: 25,0 ppm

Assim, as concentrações aumentaram cerca de 10 milhões de vezes durante a progressão deste exemplo, em grande parte devido à bioampliação (ocorrendo um diferencial entre a ingestão e a secreção). Estas concentrações não foram directamente letais para os carnívoros de ordem mais elevada, mas teve repercussões na sua reprodução. O DDT, e o seu produto de degradação DDE, reduzem a deposição de cálcio nas cascas dos ovos. Os ovos das aves são assim mais facilmente quebrados durante o período de incubação, já que a casca é mais fina.

As populações de muitos predadores, como as Águias-carecas e os Pelicanos castanhos, foram quase eliminadas. O Falcão peregrino desapareceu da parte leste dos Estados Unidos devido a problemas reprodutivos surgidos nos anos 60.

O DDT e o DDE surgem também nos tecidos gordos de baleias e esquimós, muito longe de qualquer área em que se tenha aplicado este pesticida, indicando então que, devido à sua persistência, ele é transportado por longas distâncias na atmosfera e depois lavado pelas chuvas. Foi também demonstrado que pode aparecer no leite humano a concentrações extraordinariamente elevadas, tão elevadas que o leite não poderia ser vendido comercialmente se fosse leite de vaca.

Se pensarmos no assunto, os bebés humanos alimentados por leite materno estão no topo da cadeia alimentar, e são portanto muito susceptíveis aos efeitos de bioampliação e bioconcentração. Relativamente a compostos persistentes como o DDT, o leite humano é o alimento mais contaminado. Normalmente, as concentrações de organoclorados em leite humano são 10 a 20 vezes superiores às do leite de vaca, sendo os níveis mais elevados superiores aos níveis permitidos para os produtos comerciais.

Assim como investigadores pensavam que o DDT não era tóxico para os mamíferos, acredita-se cada vez mais que, a concentrações elevadas e em exposições crónicas e de longa duração, pode estar envolvido em casos de cancro de fígado, anormalidades reprodutivas e outros efeitos em mamíferos, incluindo humanos.

Estas preocupações levaram a que a Agência de Protecção Ambiental (EPA – US Environmental Protection Agency) cancelasse o registo do DDT em 1972, que é necessário para que possa ser aplicado e vendido, excepto em alguns casos excepcionais. No entanto as exportações continuaram até ao fim dessa década.

O DDT é usado ainda intensamente em países menos desenvolvidos. E, ironicamente, quando a última fábrica de produção do DDT nos EUA foi desmantelada em 1983, foi vendido à Indonésia, onde ainda produz o DDT.

Desde a época da proibição do DDT nos EUA, as populações de muitos dos pássaros predadores recuperaram notavelmente. De qualquer maneira, existe informações que sugerem que muitos dos pesticidas usados hoje nos EUA são tóxicos para os pássaros, resultando na morte de milhares por ano, mesmo quando usados da forma recomendada.

Em Dezembro de 2000, 122 nações assinaram um tratado pretendendo excluir os poluentes orgânicos persistentes (POP's), incluindo o DDT. Entretanto, vinte e cinco países em vias de desenvolvimento conseguiram excepções, permitindo que se mantenha o uso do DDT, porque é o agente mais barato e acessível na defesa contra os mosquitos transmissores da malária. Este assunto relativo à malária e o DDT é realmente problemático, já que entre 1 e 3 milhões de pessoas morrem em cada ano, resultante da malária. Em alguns casos, o DDT é ainda eficaz contra os mosquitos transportadores da doença, e muitos povos sentem que os benefícios de continuar a usá-lo para esta finalidade compensam os riscos. Os problemas relativos à resistência dos insectos ao pesticida parecem forçar uma mudança de atitude em relação às formas de controlo. Há um sucesso considerável com o uso de redes de cama tratadas com um insecticida e suspensas sobre a cama de uma pessoa) protegendo-a durante a noite, já que é durante a noite que os mosquitos são os mais activos.

Estes POP's são geralmente lipossolúveis (como o DDT), e são também muito dispersáveis (surgindo em formas que podem viajar grandes distâncias). A lista dos POP-12 coberto pelo tratado inclui nove pesticidas (aldrin, chlordane, DDT, dieldrin, endrin, heptachlor, hexachlorobenzene, mirex e toxaphene) assim como PCB's, furanos, e dioxinas. As dioxinas são um subproduto de alguns tipos de fábricas de papel, sendo também produzidos em

outros processos. O "agente laranja", utilizado durante a guerra do Vietname foi implicado numa diversidade de problemas de saúde, e as dioxinas são agentes causadores para diversos destes problemas. As dioxinas não são parte dos ingredientes activos do agente laranja (que são 2,4,5-T e 2,4-D), mas são subprodutos de sua produção. A EPA escreveu, em 1985, que as dioxinas são "o carcinogénico mais potente testado em animais de laboratório." Muitos mais POP's podem ser adicionados à lista de compostos proibidos, mas os estudos ecológicos/epidemiológicos que os ligam a danos ao ser humano ou no ecossistema não foram ainda concluídos.

Um outro objectivo interessante deste tratado era a aceitação do "princípio preventivo" que inverte a tradicional obrigatoriedade da prova. Em vez de supor que um composto é inofensivo a menos que se possa demonstrar que é perigoso, os produtores devem evitar a produção do provável POP mesmo se não está provado realmente que é um POP, isto é, supõem-se serem "culpados" de causar dano até que esteja provado não o serem. Uma outra maneira de explicar o princípio preventivo será dizer que, se uma tecnologia ou uma actividade puderem representar uma ameaça ou dano, as medidas de prevenção para impedir que o dano ocorra estão autorizadas.

A indústria química respondeu à preocupação relativamente ao DDT e seus congéneres com novas classes de pesticidas, menos persistentes do que os organoclorados, mas geralmente mais solúveis em água (tendo então consequentemente maior potencial para contaminar a água da superfície e o solo) e também frequentemente mais tóxicos.

A sua toxicidade é demonstrada nas quantidades reduzidas necessárias para que sejam eficazes:

Em 1945, o DDT foi aplicado tipicamente a uma taxa de 2 kg/ha.

Hoje, níveis similares do controlo são obtidos com aldicarb e pireteroídes em concentrações de 0.1 e 0.05 kg/ha (50 g/ha), respectivamente. Isto é, estão sobre 10 vezes mais eficazes (ou tóxicos), e em alguns casos 40 vezes mais. Uma solução para um problema pode criar problemas novos.

Nos anos 60, quando foi publicado o livro "Silent Spring", o debate sobre os pesticidas era confinado às nações industrializadas. Hoje, os pesticidas são produzidos e usam-se por todo o mundo.

A Índia, por exemplo, usou, em 1960, pesticidas em 6 milhões de hectares, quando em 1988 o total tinha aumentado para 80 milhões de hectares tratados por ano. Brasil, Índia, e México estão, actualmente, entre os maiores consumidores de pesticidas do mundo. Os principais produtores são os EUA, a Europa Ocidental e o Japão. O uso de pesticidas no terceiro mundo aumentou extremamente durante a "Green Revolution" a partir dos anos 60, porque:

(1) O aumento da produção das colheitas era mais susceptível a algumas pragas e doenças do que eram as espécies nativas e foram sendo cultivadas em monoculturas e não em misturas de variedades e culturas. Contrastando com este facto, as culturas tradicionais tinham desenvolvido resistência à maioria das pragas e doenças locais. Assim, tornou-se necessário usar mais pesticidas para manter a vantagem do rendimento das variedades novas.

(2) O uso de pesticidas em países pouco desenvolvidos também aumentou porque produzem cada vez mais frutas e vegetais para a venda a países mais desenvolvidos, tais como os EUA. A venda é feita a preços elevados para que possam tornar a compra de pesticidas possível. Além disso, os consumidores da maioria dos mercados do norte (União Europeia e EUA) têm padrões cosméticos elevados tanto para frutas como para vegetais, sendo necessário que as colheitas estejam bem protegidas das pestes e das doenças. Esta tendência para as frutas e vegetais cultivados em nações em vias de desenvolvimento serem comercializadas nos mercados do norte, conduziu a um interesse sobre resíduos de pesticidas nos produtos importados.

(3) Uma terceira razão para o aumento no uso de pesticidas em países em vias de desenvolvimento relaciona-se com as circunstâncias causadas pelo uso de variedades e de tecnologias trazidas pela "Green Revolution". Além das monoculturas referidas acima, o aumento da irrigação e da fertilização proporcionam melhores condições para o desenvolvimento das pestes, sendo necessário maior esforço do seu controlo.

Os países em vias de desenvolvimento ainda não usam tanto os pesticidas como no mundo industrializado, porém o uso de pesticidas em muitos países de terceiro mundo não é regulado.

Por exemplo, o terceiro maior utilizador do mundo do DDT (a seguir da Índia e do Brasil) é as Nações Unidas (NU). As NU usam o DDT para o controlo do mosquito da malária. De facto, cerca de metade dos pesticidas usados em

países em vias de desenvolvimento são organoclorados persistentes, tais como o DDT. São usados porque são mais baratos e são considerados mais seguros para agricultores por causa da sua toxicidade a curto prazo relativamente baixa para os mamíferos.

Algumas nações ocidentais exportam ainda produtos químicos que são proibidos ou restringidos nos seus próprios mercados, embora esteja a ser menos comum do que acontecia anteriormente. O que frequentemente ocorre é a exportação depois de um produto ter sido proibido nesse país. As nações importadoras e os fabricantes discutem que, para o importador, os benefícios na produção de alimentos e na saúde da população compensam os riscos.

De acordo com um estudo de 1996 da Fundação para avanços na ciência e na educação, de 1992 a 1994, os EUA exportaram pelo menos 11,3 milhões de libras de pesticidas que são proibidos nos EUA, e um total de 156 milhões de libras dos pesticidas que são considerados "perigosos". O chlordane, por exemplo, é "proibido" neste país e também em outros 47, é persistente no ambiente durante cerca de 30 anos, contudo é exportado para Argentina, Venezuela e nações asiáticas.

Entretanto, é difícil saber exactamente quanto e que produtos químicos estão a ser exportados pelos EUA. Após ter analisado os registos alfandegários, a Fundação para avanços na ciência e a educação relatou que 0,23 milhões de toneladas dos produtos químicos agrícolas (cerca de 74% de todas as exportações de pesticidas dos EUA) foram enviadas com a identidade do produto e o nome do fabricante escondidos, para proteger segredos de marketing, como é permitido pela lei.

Naturalmente, algumas destas exportações retornam aos EUA no formulário dos resíduos em colheitas da exportação. Um estudo pelo grupo de funcionamento ambiental encontrou que 27% de uvas chilenas estavam contaminadas com Vinclozolina, quando menos de 1% de uvas dos EUA sofrem desta contaminação. Em termos gerais, de 1985 a 1995, mais de 14.000 carregamentos foram apreendidos nas fronteiras dos EUA por causa de resíduos de pesticidas, vindo os problemas mais frequentes do México e Guatemala.

Uma organização sem fins lucrativos chamou o Grupo de Trabalho Ambiental, que relata periodicamente os riscos de saúde dos pesticidas em vegetais. O

grupo diz que é possível cortar a exposição a pesticidas significativamente reduzindo o consumo de um grupo de 12 frutas e vegetais que se descobriu serem os mais contaminados. Em 1999, estes eram morangos, pimentas (vermelha e verde), espinafres, cerejas, pêssegos, aipo, maçãs, alperces, feijões verdes, uvas chilenas e pepinos.

Os insectos, patogénicos da planta, e as ervas daninhas reduzem a produção de colheita dos EUA aproximadamente 37% em cada ano. Isto é, as perdas ficam praticamente inalteradas desde a utilização intensiva dos pesticidas!

Dado que o uso do pesticida aumentou durante este tempo, isto significa que estamos utilizando cada vez mais pesticidas para conseguir um nível razoavelmente constante de controlo das pragas. Em alguns casos, as perdas devidas a pestes estão a aumentar: por exemplo, nos EUA, entre 1945 e 1989, as perdas devidas a insectos duplicaram, passando de 7% para 13%, apesar de um aumento de dez vezes na quantidade e na toxicidade dos insecticidas aplicados.

As perdas devidas às ervas daninhas nos EUA diminuíram ligeiramente desde 1942, de 14% para 12%. Entretanto, durante este tempo houve um aumento de cerca de 100 vezes relativamente ao uso do herbicida.

Relativamente às colheitas dos EUA, os dados publicados pelo Worldwatch Institute indicam que, enquanto o uso de pesticidas aumentou dez vezes entre os anos 1940 e 90, as perdas devidas às pragas aumentou também de 30% para 37%.

Porque é que as perdas relativas às pestes permanecem estáveis apesar do aumento das quantidades de pesticidas aplicados? Existem muitas razões:

1) As taxas de perda relativas às pestes são em parte artificiais, já que houve mudanças em padrões de qualidade e aparência dos consumidores e em padrões da indústria. Assim, existem situações que podem ser consideradas de perda que não eram consideradas como tal há algumas décadas atrás.

2) Muitas pragas desenvolveram resistência aos pesticidas. Esta resistência significa que os produtos químicos são menos bem sucedidos a controlar as pestes, que resulta frequentemente na aplicação de quantidades mais elevadas.

A resistência aos pesticidas tem bases genéticas e o desenvolvimento da resistência em populações da peste é um dos melhores exemplos que nós

temos da ocorrência da selecção natural. O fenómeno é-nos também familiar na medicina, onde os interesses sobre as bactérias resistentes a antibióticos estão a aumentar.

3) Uma terceira razão para a estabilidade ou aumento das perdas devidas às pestes é a diminuição do uso da rotação de culturas. Plantar o mesmo campo ano após o ano com o mesmo tipo de cultura é um factor muito importante para que as populações da peste aumentem nessa região.

Um exemplo deste efeito envolve o milho nos EUA. Nos anos 40, quase nenhum insecticida foi aplicado ao milho e as perdas causadas pelos insectos eram cerca de 3,5% da produção. Desde então, o uso do insecticida no milho aumentou mais do que 1000 vezes, e as perdas aumentaram para 12%. Este facto é atribuído principalmente à redução na rotação de culturas. Quando o milho é usado em rotação com uma outra cultura, as pestes do milho não sobrevivem, a população da peste declina durante os anos em que não se cultiva milho. No entanto, o milho tem sido cultivado continuamente nos mesmos campos, resultando em fonte de alimentação para estas populações de pestes, que aumentam imensamente.

Investigações recentes sugerem que os insectos podem evoluir para se adaptarem a uma rotação regular. Assim, podem, em alguns casos, mudar o seu ciclo de vida para combinar com o ciclo da rotação.

4) Em alguns casos, o conhecimento de que a protecção de um pesticida existe promove a escolha de algumas variedades que são menos resistentes às pestes, porque têm alguma característica desejável não encontrada em variedades resistentes da colheita e sabem que podem contar com a protecção dos pesticidas.

5) A mobilidade das colheitas e das pestes aumenta as perdas devidas às pestes e a necessidade de controlo sobre a peste. De facto, grande parte das pragas existentes por todo o mundo é devida à mobilidade das culturas. Um exemplo deste efeito envolve a introdução de colheitas em novas regiões. A batata comercial é nativa da Bolívia e do Peru. Nos EUA, onde as batatas historicamente não existiam, não havia um insecto que se alimentasse da espécie nativa e parente da batata, Solanums. Quando a batata foi introduzida nesse país, este besouro espalhou-se rapidamente e é agora a peste das

batatas mais problemática no mundo. A batata não tinha sido exposta anteriormente ao besouro pelo que não teve qualquer resistência.

6) A redução da diversidade genética das culturas, associada à Revolução Verde, agrava os problemas de pragas e requer maiores quantidades de pesticidas para se obter controlo sobre as pestes.

As variedades híbridas das culturas da Revolução Verde são frequentemente mais uniformes em termos genéticos do que eram as culturas tradicionais, incluindo nas respostas às pestes e às doenças. Quando, historicamente, os impactos das pestes foram reduzidos devido à heterogeneidade genética das plantas (algumas plantas de um campo eram mais resistentes do que outras), a agricultura moderna reduziu este factor plantando variedades mais homogéneas. Além disso, os agricultores restringem cada vez mais as variedades da cultura que plantam, aumentando a proporção de campos com a mesma variedade.

Importa referir que existem controlos naturais sobre as populações das pestes, que incluem a resistência genética das plantas, as doenças que afectam as pragas, os predadores naturais das pragas e o clima adverso. Estes factores fizeram e fazem com que as plantas tenham conseguido coexistir com as pragas durante milénios, sendo que muito poucas espécies podem ter sido extintas devido a doenças ou a acção de pragas. O que acontece, porém, é que os pesticidas também interagem com estes controlos naturais, desequilibrando o sistema. Se bem que os pesticidas não provoquem alterações directas nas plantas de forma a modificar a sua resistência genética às pragas, de facto eles reduzem a pressão sobre a espécie para desenvolver resistências naturais, pelo que as plantas se tornam menos resistentes às pragas, e daí cada vez mais dependentes dos pesticidas. Por outro lado, os pesticidas não provocam a morte apenas das pragas, mas também de outros seres, incluindo, por vezes, os predadores naturais das próprias pragas e também de outras que estejam de alguma forma naturalmente sob controlo. Assim, a aplicação de pesticidas pode provocar um aumento brutal da população da praga devido à eliminação dos seus predadores naturais, se a aplicação do produto não exercer o controlo desejável ou se reduzir as suas fontes de alimento, fazendo com que a praga possa, num momento posterior, desenvolver-se muito mais rapidamente.

2.4 - Filosofias de aplicação de pesticidas

Existem várias filosofias sobre as aplicações de pesticidas. Vimos acima algumas referências a elas. Assim, temos a filosofia mais comum, utilizada de uma forma generalizada pela Europa ocidental. Existe também a filosofia derivada da Revolução Verde, "Green Revolution", mais enraizada nos países do continente americano. Finalmente temos a Protecção Integrada, uma filosofia relativamente recente, com preocupações ecológicas e que, lentamente, se está a introduzir em todo o mundo. Estas filosofias serão descritas de forma breve para compreender melhor a Protecção Integrada.

A prática comum de aplicação de pesticidas é seguir uma calendarização estabelecida a partir do aparecimento das pragas nas culturas. Essa calendarização é normalmente estabelecida por empresas do sector agroquímico, nunca descurando os seus próprios interesses. Assim, o agricultor é levado a aplicar produtos fitoquímicos sem que as pragas tenham realmente afectado as suas culturas, na tentativa de actuar preventivamente. As quantidades aplicadas dos produtos, em caso de aparecimento de uma peste, são bastante variáveis, tendo as aplicações como propósito o desaparecimento por completo da praga. Ora este comportamento leva a desperdícios financeiros porque a aplicação dos produtos pode ser desnecessária. Pode também originar problemas ambientais porque a aplicação desmesurada e excessiva dos fitoquímicos é sempre prejudicial para o ambiente e para a fauna e flora circundante à área sujeita às aplicações. Conclui-se que esta filosofia de aplicação de produtos químicos não é a mais acertada pois não consegue prevenir o aparecimento das pragas, exige o dispêndio financeiro para aplicação de produtos sem que o problema se tenha manifestado e coloca problemas de contaminação de solos e intoxicação de culturas.

A Revolução Verde [10] (RV), é um processo de desenvolvimento tecnológico de técnicas agrícolas que começou no México em 1944, e se tem espalhado pelo mundo inteiro. O objectivo fundamental da RV é o aumento da eficiência dos processos agrícolas para que a produtividade das culturas seja aumentada

e se possa ajudar os países em vias de desenvolvimento a fazer face às necessidades da sua população em rápido crescimento. A RV foi sempre alvo de grandes críticas, desde a sua introdução, e tem vindo a ser substituída pela agricultura integrada e pela agricultura orgânica ou biológica.

A RV começou em 1944 quando a Fundação Rockefeller fundou um instituto para melhorar o rendimento agrícola das quintas do México. Esta aposta produziu resultados surpreendentes, fazendo com que o México passasse de uma situação de importar metade do seu trigo à auto-suficiência em 1956, a exportar em 1964 meio milhão de toneladas.

A partir destes resultados, a tecnologia foi exportada para outros países, para diversas regiões de todo o mundo. O sucesso no aumento da produção dos campos de cultivo era incontestável. O crescimento da produção das culturas foi tal que a agricultura conseguia ultrapassar o crescimento da população. Esse aumento da produção per capita disparou a partir de 1950.

As tecnologias introduzidas pela RV são de duas áreas distintas: a primeira relativamente ao cultivo de novas variedades de plantas e a outra, o desenvolvimento de novas técnicas agrícolas.

A maioria dos produtos consumidos pela população dos países industrializados provém de culturas da RV. A criação das variedades híbridas foi motivada pelo desejo de aumentar a produtividade das culturas, a durabilidade de transporte e a longevidade de armazenamento. São chamadas variedades híbridas porque foram criadas a partir do cruzamento de muitas variedades de forma a produzir a desejada combinação de características numa única variedade, embora seja também utilizada a mutagénese aleatória. Como o aumento da produtividade das culturas foi feita a partir do uso de combustíveis fósseis, a eficiência das estirpes da RV alterou este facto, já que as estirpes são mais eficientes a utilizar os fertilizantes químicos e também são mais facilmente colhidos.

As técnicas desenvolvidas e refinadas pela RV foram: o uso extensivo de fertilizantes químicos, irrigação, o uso de maquinaria pesada e o uso de pesticidas e herbicidas. Quanto ao uso de fertilizantes químicos, cada planta depende de vários compostos para que possa crescer. Primeiramente, precisa de azoto. As plantas conseguem absorver azoto que necessitam apenas sob a forma de nitrato. Certos microorganismos que se encontram no solo são

capazes de transformar o azoto atmosférico em nitratos. Pode também acontecer a fixação biológica através de microorganismos que vivem em pequenos nódulos nas raízes de certas plantas, como por exemplo, legumes. O Fósforo também é necessário, sob a forma de fosfatos, assim como são necessários alguns dos elementos vestigiais. O pH do solo pode ser ajustado para as condições óptimas da cultura em questão. Antigamente, as condições do solo eram preparadas a partir de técnicas culturais como a rotação de culturas, a mistura de culturas ou fertilizantes orgânicos, como o estrume. O maior desenvolvimento da RV neste campo foi o uso dos fertilizantes químicos para fazer o ajuste do pH do solo e alcançar os níveis correctos de todos os compostos químicos que são importantes para o crescimento da planta. Em relação à irrigação, apesar de ter sido usada durante centenas de anos na agricultura, a RV veio introduzir métodos de irrigação que produzem uma irrigação mais eficiente. Relativamente à maquinaria usada, a ceifeira debulhadora e outra maquinaria não eram novidades na agricultura, mas a RV permitiu a redução drástica da utilização da mão-de-obra humana na agricultura através do aumento da utilização de maquinaria até à automação de todos os processos possíveis. Finalmente, o desenvolvimento de pesticidas e herbicidas químicos (incluindo organoclorados e organofosfatos) permitiu um aumento adicional da produtividade das culturas através de um controlo eficiente de ervas daninhas e erradicação de pragas. Mais recentemente, têm sido desenvolvidas estirpes de culturas que são mais tolerantes aos herbicidas e insecticidas aplicados, permitindo então a aplicação destes produtos sem que a planta seja afectada.

Apesar de todas estas vantagens que a RV introduziu, continua a ser objecto de duras críticas, sobre variados aspectos, sendo o principal relativamente ao capítulo ambiental. Os críticos apontam os seguintes factos: perda da biodiversidade e qualidade alimentar, dependência de combustíveis fósseis, poluição e degradação dos solos. A disseminação dos híbridos e das técnicas associadas à RV provocou uma diminuição das variedades de culturas que em alguns casos chegou a atingir os 90%. A dependência de uma cultura em poucas variedades significa o aumento da fragilidade da população e a diminuição da capacidade de evoluir no futuro, além da perda inerente em termos qualidade e variedade nutricional. As principais preocupações com as

culturas são centradas na eficiência de crescimento e longevidade (e por vezes aparência) e não em serem saudáveis. Como acontece com a maioria dos híbridos, estas culturas têm menor valor nutricional que os seus antepassados. Enquanto a produção agrícola aumentou em consequência da RV, a energia dispendida para produzir as culturas também aumentou, resultando assim numa diminuição de cultura produzida por energia dispendida ao longo do tempo. As técnicas da RV dependem também dos fertilizantes químicos e de pesticidas, os quais são muitas vezes produzidos a partir de combustíveis fósseis, fazendo com que a agricultura ficasse cada vez mais dependente de produtos petrolíferos. A degradação de fertilizantes e pesticidas continua a ser uma fonte significativa de poluição, sendo uma das maiores fontes poluidoras de recursos hídricos. Apesar de tóxicos, perigosos e muitas vezes cancerígenos, os pesticidas da primeira metade do século XX foram quase todos banidos (com algumas excepções que ocorrem em países do terceiro mundo) mas os seus efeitos permanecem. Existem também críticas de que a RV destrói a qualidade dos solos ao longo do tempo. Este é o resultado de vários factores, incluindo o aumento da salinidade do solo através da grande irrigação, o "queimar" do solo devido ao uso intensivo de fertilizantes químicos, a morte de microorganismos do solo benéficos para as culturas, a erosão do solo e a perda de elementos vestigiais importantes. Esta degradação da qualidade dos solos vai aumentar a dependência no uso de produtos químicos como compensação, mas em última análise, esse processo não resultará.

Finalmente, há também a dimensão social que deve ser considerada. A RV introduziu grandes alterações num mundo em que a maioria dos seus habitantes ainda depende do cultivo dos seus próprios alimentos. O resultado de muitas destas técnicas foi o encorajamento de uma agricultura industrializada em larga escala, em prejuízo dos pequenos agricultores, que não são capazes de ser competitivos. Isto levou a uma urbanização e pobreza entre o sector agrícola e perda das suas terras para as grandes companhias agrícolas. No entanto, no nosso país não ocorreram transformações tão profundas do tecido agrícola devido a estes factores já que o relevo é um factor extremamente limitador assim como é a excessiva parcelização dos campos de cultivo, o que levou a que não ocorresse uma introdução significativa deste tipo de práticas agrícolas.

Em última análise, a RV ajudou a produção agrícola a acompanhar o crescimento da população, com prejuízo do meio ambiente.

Recentemente surgiu uma nova filosofia de práticas agrícolas, denominada indistintamente Protecção Integrada ou Produção Integrada [11,12,13]. Pela bibliografia consultada, nomeadamente vários documentos da Direcção Geral de Protecção de Culturas, verificou-se que as duas designações podem ser utilizadas, visto que significam a mesma coisa. A Protecção Integrada baseia-se simplesmente em produzir com qualidade, privilegiando métodos seguros ecologicamente a partir da redução do uso de produtos agroquímicos. Esta filosofia está bem patente no lema de uma grande empresa de pesticidas, a Bayer: "Tão poucos produtos quanto possível, mas tantos quanto necessário"[11]. Estas práticas não se referem apenas à aplicação de produtos químicos mas também a um conjunto de outras práticas culturais, desde a instalação da cultura até à recolha do produto final.

A Protecção Integrada pode ser introduzida em diversos tipos de cultura. No presente caso, é importante a abordagem do caso específico da Protecção Integrada da Vinha. Será feita uma breve descrição do caso particular da vinha, incluindo as medidas, normas e procedimentos sugeridos no seu âmbito, mas sem ter a presunção de que o presente texto possa substituir os manuais existentes para esse efeito.

De uma forma geral, a protecção integrada da vinha tem como principal objectivo a produção económica de uvas de alta qualidade, dando prioridade a métodos seguros ecologicamente, minimizando os efeitos secundários e o uso de agro-químicos, de modo a salvaguardar o ambiente e a saúde humana.

Tentando resumir, a Protecção Integrada concilia as exigências económicas, ecológicas e toxicológicas de uma forma social e ambientalmente sustentável. A Protecção Integrada como sistema de protecção de culturas encontra-se intimamente ligada ao acto responsável nas tomadas de decisão quer directas (observação e intervenção), quer indirectas (prevenção) dos diversos agentes que nela intervêm, quer sejam técnicos ou agricultores.

De uma forma geral, a protecção das culturas segundo esta técnica assenta em 5 pontos fundamentais:

- Prevenção cultural;
- Diagnóstico da situação;

- Estimativa de risco;
- Nível económico de ataque;
- Selecção dos meios de protecção.

A prevenção cultural implica um conjunto de medidas agronómicas abrangentes de carácter preventivo, que têm como objectivo garantir o bom desenvolvimento fitossanitário das culturas, como por exemplo: a correcta localização da plantação, selecção do material vegetativo utilizado, fertilizações equilibradas, manutenção dos "hospedeiros" de forma a albergarem os auxiliares e gestão da água. Já o diagnóstico da situação implica uma correcta identificação e um conhecimento da bioecologia dos inimigos das culturas, quer sejam fungos, doenças ou infestantes. A estimativa de risco define-se como a avaliação quantitativa dos inimigos das culturas e a análise da influência de certos factores nos prejuízos que possam causar. Implica o conhecimento e a utilização de técnicas de estimativa do risco, quer sejam quantitativas (observação, técnicas das pancadas, cintas, armadilhas...), quer sejam qualitativas (dado meteorológicos...) e permite avaliar as potencialidades de risco para as culturas provocadas pelos inimigos e a oportunidade de tratamento. O nível económico de ataque deriva da noção de tolerância, e constitui um princípio fundamental em Protecção Integrada, definindo-se como a intensidade de ataque de um inimigo da cultura a que se devem aplicar medidas limitativas ou de combate para impedir que a cultura corra o risco de prejuízos superiores ao custo das medidas de luta a adoptar, acrescidos dos efeitos indesejáveis que estas últimas possam provocar. Finalmente, a selecção dos meios de protecção implica o conhecimento correcto das características dos produtos, nomeadamente a sua acção sobre os inimigos das culturas, doses de utilização/problemas, épocas de aplicação, esquemas de tratamento, selectividade sobre as culturas, homem e organismos auxiliares, toxicidade, persistências e intervalos de segurança. Além disso, é sempre imprescindível prestar a devida atenção à informação contida nos rótulos de quaisquer produtos a aplicar.

Relativamente aos produtos químicos que são aplicados à luz da Protecção Integrada, eles devem ter certas características:

- Baixa toxicidade para o Homem;
- Perfil eco-toxicológico favorável (organismos auxiliares e outros organismos vivos);
- Selectividade natural;
- Elevada eficácia biológica;
- Segurança relativamente ao Homem e ao Ambiente;
- Fraca persistência e mobilidade no solo.

A Protecção Integrada abarca não só indicações relativamente à aplicação de produtos fitossanitários, mas também procedimentos para a instalação de uma vinha e para a fase de produção de uma vinha, focando aspectos climatéricos, fertilização e aplicação de outros produtos correctores de deficiências, selecção dos cultivares, manutenção do solo, poda e condução da vinha, intervenções na vinha e rega. Como não é fundamental para o esclarecimento do trabalho, não é feita mais alguma referência a estes aspectos no texto.

A videira é uma planta de folha caduca que permanece em estado de dormência durante o Inverno pelo que quando chega a Primavera, os seus gomos entumescem e abrolham, iniciando um novo ciclo vegetativo que se vai prolongar, de uma forma genérica, até Outubro. Como acontece com outras espécies de plantas espontâneas e cultivadas, podem ser hospedeiras de diferentes inimigos. A grande dependência do desenvolvimento vegetativo da cultura e dos seus inimigos em relação às condições ambientais, permite estabelecer relação entre o estado vegetativo da planta e o desenvolvimento dos seus inimigos. Nesta perspectiva, considera-se que, na protecção da cultura da vinha, na óptica da protecção integrada, é muito importante estabelecer a correlação entre a fenelogia, factores climáticos e a evolução dos seus inimigos. Deste modo, considera-se fundamental acompanhar e registar a evolução dos factores referidos para determinar a melhor oportunidade de realização de intervenções. Para o registo dos estados fenológicos devem marcar-se seis plantas, representativa de cada cultivar, sobre as quais devem incidir as observações a realizar. Considera-se que determinado estado fenológico é atingido numa cultivar quando 50% dos órgãos vegetativos se encontra nesse estado. Na evolução dos inimigos considera-se, além dos

aspectos básicos correspondentes à indicação das principais pragas e doenças, os períodos de monitorização e de estimativa do risco assim como as substâncias activas que podem ser aplicadas na luta contra aqueles inimigos.

Outros aspectos devem ser considerados na escolha de um produto, sendo exemplo os organismos auxiliares a proteger. Assim a partir das substâncias activas aconselhadas deve ser feita a sua separação em substâncias activas recomendadas e complementares. Consideram-se substâncias "recomendadas" as substâncias activas que, em regra, aparecem classificadas como pouco tóxicas relativamente a fitoseídeos e como "complementares" as restantes.

Das descrições feitas ressaltam as principais diferenças entre a Protecção Integrada e as práticas agrícolas utilizadas e enraizadas até há bem pouco tempo. Enquanto anteriormente se estabeleciam calendários com os períodos de ataque preferenciais para certas pragas e, portanto, eram realizadas aplicações de agroquímicos conforme o previsto, de acordo com a Protecção Integrada essas aplicações devem ser feitas exclusivamente quando o ataque de uma praga for suficientemente intenso para provocar danos económicos graves e não puder ser resolvido por outra via. Também a quantidade de produtos a aplicar está de acordo com a intensidade do ataque, para que não se aplique uma quantidade excessiva de produtos fitossanitários, resultando na "intoxicação" da cultura. Este procedimento não era habitual. Por outro lado, os produtos aplicados são cuidadosamente escolhidos e requerem a aprovação prévia de organismos competentes para serem incluídos na lista de produtos fitoquímicos cujo uso está autorizado no âmbito da Protecção Integrada. Esses produtos são estudados em termos de toxicidade para organismos inofensivos para as culturas e para o Homem, e as suas selectividades e persistência e mobilidade no solo.

Em jeito de conclusão, parece que a agricultura teria bastante a ganhar com a introdução da filosofia da Protecção Integrada em todas as culturas em que isso fosse possível. Os ganhos seriam tanto económicos como ambientais.

2.5 Degradação dos pesticidas

Os pesticidas são produtos químicos criados pelo Homem para combater diferentes tipos de pragas. Como qualquer substância química, eles estão sujeitos à intervenção de diversos factores que vão provocar o seu desaparecimento. Os pesticidas são então transformados noutros compostos, com características semelhantes ao composto inicial mas, normalmente, de menor peso molecular.

Existem vários factores que podem provocar a degradação de um pesticida. Como são aplicados, geralmente, ao ar livre, as condições climatéricas são os primeiros responsáveis pela decomposição. A água, proveniente da chuva e da humidade atmosférica, provoca a hidrólise dos pesticidas. Como o ar possui sempre algum vapor de água, este tipo de acção está sempre presente. A luz induz a fotodecomposição dos compostos. Neste caso, os raios UV serão os principais responsáveis pela acção da luz. Outro factor importante é a temperatura. Se esta for elevada, a decomposição térmica dos pesticidas é maior.

Os seres vivos contribuem também para o desaparecimento dos pesticidas. Bactérias e fungos promovem a sua decomposição, assim como os restantes seres vivos que estão em contacto com esses produtos.

Durante a produção de um vinho, as condições do meio vão sendo alteradas, já que a constituição da uva é bastante diferente da do vinho. Basta referir a existência de etanol no vinho, o que não acontece na uva, enquanto nesta última existem bastantes açucares. Ao longo desse processo decorre a actividade das leveduras, que transformam o açúcar em álcool. Esta acção contribui também para a degradação dos pesticidas existentes. Assim, além de todos os factores ambientais a que os pesticidas estão sujeitos quando são aplicados nas vinhas, após a vindima, e durante toda a vinificação, eles são sujeitos a condições que promovem a sua decomposição. No entanto, as diversas fases da vinificação devem ter influência diferente sobre a decaímento dos pesticidas porque as condições do meio e da matriz vão sendo diferentes.

A degradação dos pesticidas origina o aparecimento de compostos que inicialmente não estariam presentes. Esses produtos de transformação podem

ser tão ou mais perigosos para a saúde dos seres vivos e para o ambiente como os próprios pesticidas. Desta forma, torna-se importante estudar os mecanismos de degradação de cada pesticida, de forma a identificar que possam ser mais perigosos que o seu precursor. Claro que os mecanismos são influenciados pelo meio onde ocorre a decomposição dos pesticidas. Um meio na ausência de luz não produzirá os mesmos produtos que um com luminosidade, por exemplo.

Assim, o estudo dos pesticidas, do seu desaparecimento, dos produtos que originam e da toxicidade destes últimos são fundamentais para avaliar a utilização de qualquer produto deste tipo no meio ambiente.

2.6 Os pesticidas utilizados no estudo

Os pesticidas que foram estudados fazem parte da listagem de produtos permitidos segundo a Protecção Integrada [14]. Além destes produtos, foram também aplicados nas vinhas outros produtos, muitos com finalidades idênticas mas com compostos activos diferentes. Dessa forma, será feita aqui uma pequena descrição dos compostos activos que foram utilizados no estudo e também dos que foram aplicados nas vinhas nos últimos 5 anos, visto que podem ocorrer nos ensaios a realizar.

A lista dos produtos aplicados nos últimos 5 anos encontra-se na Tabela 2.1.

A lista dos produtos aplicados no ano referente à colheita em que se realizou o estudo encontra-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 – Lista de produtos aplicados nos 5 anos anteriores ao estudo

Pesticida	Nome comercial
Enxofre	Thiovit
Folpete + Fosetil-alumínio	Rhodax
Azoxistrobina	Quadris
Hidróxido de Cobre	Kocide
Flufenoxurão	Cascade
Irpodiona	Rovral
Lufenurão	Match 50
Metalaxil + Oxicloreto de Cobre	Ridomil Cobre
Cimoxanil + Folpete	Vitipec
Oxicloreto de Cobre + Propinebe	Cupravit
Flusilazol + Cimoxanil + Folpete	Olymp Duplo
Folpete + Metalaxil-M	Ridomil Combi 50
Cimoxanil + Propinebe + Oxadicil	Milraz Super
Vinclozolina	Ronilan
Ciprodinil + Fludioxinil	Switch
Fenarimol + Quinoxifena	Vento

Tabela 2.2 – Lista de produtos aplicados no ano do estudo

Pesticida	Nome comercial
Enxofre	Thiovit
Folpete + Fosetil-alumínio	Rhodax
Irpodiona	Rovral
Metalaxil + Oxicloreto de Cobre	Ridomil Cobre
Cimoxanil + Folpete	Vitipec
Folpete + Metalaxil-M	Ridomil Combi 50
Cimoxanil + Propinebe + Oxadicil	Milraz Super

A lista dos produtos em estudo é apresentada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Lista dos produtos estudados

Pesticida	Nome comercial
Diclofluanida	Euparene
Dicofol	Kelthane
Fenarimol	Rubigan
Imidaclopride	Confidor
Mancozebe	Mancozan
Miclobutanil	Systhane S
Procimidona	Driza
Vinclozolina	Ronilan

Seguidamente será feita uma apresentação de alguns dados importantes para cada um dos pesticidas que foi estudado. Os dados englobam a família química a que pertencem, a praga que combatem, o intervalo de segurança indicado pela Direcção-Geral de Protecção das Culturas [14], se é sistémico ou não e, finalmente, o tempo de semi-vida [15]. As Tabelas 2.4 a 2.11 apresentam os dados referidos para cada pesticida.

Tabela 2.4 – Dados referentes ao Diclofluanida

Pesticida	Diclofluanida
Família química	N-tiotrihalometilo
Praga que combate	Míldio - Preventivo
Sistémico	Não
Intervalo de segurança	3 semanas
Tempo de semi-vida	8 dias

Tabela 2.5 – Dados referentes ao Dicofol

Pesticida	Dicofol
Família química	Organoclorado
Praga que combate	Acaricida
Sistémico	Não
Intervalo de segurança	2 semanas
Tempo de semi-vida	47 a 85 dias

Tabela 2.6 – Dados referentes ao Fenarimol

Pesticida	Fenarimol
Família química	Pirimidil carbinol
Praga que combate	Oídio - Preventivo
Sistémico	Sim
Intervalo de segurança	1 semana
Tempo de semi-vida	12 horas

Tabela 2.7 – Dados referentes ao Imidaclopride

Pesticida	Imidaclopride
Família química	Cloronicotilo
Praga que combate	Insecticida
Sistémico	Sim
Intervalo de segurança	2 semanas
Tempo de semi-vida	Superior a 31 dias

Tabela 2.8 – Dados referentes ao Mancozebe

Pesticida	Mancozebe
Família química	Alquilinobis
Praga que combate	Míldio - Preventivo
Sistémico	Não
Intervalo de segurança	8 semanas
Tempo de semi-vida	1 a 2 dias

Tabela 2.9 – Dados referentes ao Miclobutanil

Pesticida	Miclobutanil
Família química	Azol
Praga que combate	Oídio - Preventivo
Sistémico	Sim
Intervalo de segurança	3 semanas
Tempo de semi-vida	-

Tabela 2.10 – Dados referentes ao Procimidona

Pesticida	Procimidone
Família química	Dicarboximida
Praga que combate	Podridão - Preventivo
Sistémico	Não
Intervalo de segurança	3 semanas
Tempo de semi-vida	-

Tabela 2.11 – Dados referentes ao Vinclozolina

Pesticida	Vinclozolina
Família química	Dicarboximida
Praga que combate	Podridão - Preventivo
Sistémico	Não
Intervalo de segurança	3 semanas
Tempo de semi-vida	3 dias a 3 semanas

Outro tipo de dados que são bastante importantes é os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos por lei. Não foi possível encontrar limites legais estabelecidos para vinhos, pelo que se apresentam os valores encontrados para uvas [16] (Tabela 2.12).

Tabela 2.12 – Limites máximos de resíduos para os pesticidas estudados, em uvas

Pesticida	LMR em uvas (ppm)
Diclofluanida	10
Dicofol	1
Fenarimol	0,3
Imidaclopride	0,5
Mancozebe	2
Miclobutanil	1
Procimidona	5
Vinclozolina	5

Capítulo 3 – Técnicas analíticas

Índice

CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS ANALÍTICAS **95**

3.1 INTRODUÇÃO 97

3.2 CROMATOGRAFIA 97

3.2.1 Introdução à cromatografia *97*

3.2.2 Definições básicas *99*

3.2.3 Mecanismo e eficiência da separação cromatográfica *100*

3.2.3.1 Número de pratos teóricos 101

3.2.3.2 A equação de Van Deemter 103

3.2.3.3 Implicações dos conceitos teóricos 104

3.2.4 – Exemplos de cromatografia *105*

3.2.5 Equipamentos para Cromatografia Gás-líquido *106*

3.2.6 – Análise dos cromatogramas *111*

3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA 112

3.3.1 Introdução à Espectrometria de massa. O espectro de massa *113*

3.3.2 Métodos usuais de ionização *114*

3.3.3 Instrumentação *115*

3.4 CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA. TÉCNICAS HIFENADAS 116

3.4.1 Introdução às técnicas hifenadas *116*

3.4.2 Interfaces *117*

3.4.3 Computorização e análise de dados *117*

3.5 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA 118

3.5.1 Introdução às técnicas de extracção *119*

3.5.2 Descrição da SPME *122*

3.5.3 Fundamentos da teoria de SPME *125*

3.5.4 Desenvolvimento de um método em SPME *131*

3.5.5 Aplicação da SPME à análise de pesticidas *134*

3.1 Introdução

Neste capítulo é feita uma breve descrição das técnicas analíticas utilizadas durante o trabalho. Primeiro faz-se uma descrição sobre cromatografia, incidindo principalmente na cromatografia gasosa. Em seguida refere-se a espectrometria de massa, a utilização da cromatografia gasosa em conjunto com a espectrometria de massa e finalmente, descrevem-se as características da microextracção em fase sólida.

3.2 Cromatografia [17,18,19,20,21]

Cromatografia é um conjunto de técnicas analíticas de separação, que foram usadas pela primeira vez por Tswett em 1903 [17], que visavam a separação de substâncias coradas, e daí o nome. No entanto, actualmente estas técnicas servem para separar uma grande variedade de substâncias, não sendo fundamental o facto de serem ou não coradas.

3.2.1 Introdução à cromatografia

Todos os métodos cromatográficos têm em comum o uso de duas fases distintas, uma estacionária e outra móvel. Os diferentes componentes da mistura vão sendo distribuídos por estas duas fases, dependendo a separação do movimento relativo nestas duas fases.

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com a natureza da fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida. No primeiro caso, o método designa-se por cromatografia de adsorção, sendo o segundo caso conhecido por cromatografia de partição. Neste último caso, a velocidade do movimento de um dado componente da mistura depende da sua solubilidade na fase estacionária e não de fenómenos de adsorção. Assim, as substâncias mais solúveis deslocam-se mais lentamente através da coluna, sofrendo todas elas diferentes partições entre as duas fases.

As interacções que se podem dar entre as moléculas dos diferentes componentes da mistura a analisar e a fase líquida são devidas principalmente a forças de atracção de Van der Waals e a ligações de hidrogénio. As forças de atracção de Van der Waals dividem-se em interacções dipolares, forças de indução de Debye e forças de dispersão de London. As primeiras verificam-se entre moléculas de compostos polares e são inversamente proporcionais à temperatura. As forças de indução dão-se quando uma molécula polar se aproxima de outra não polar, induzindo a formação de um dipolo. Quanto às forças de dispersão, devem-se à formação de dipolos instantâneos, nas moléculas que se encontram nas suas posições de equilíbrio. Devido a este tipo de interacções a lei de Raoult não se verifica mas, em vez dela, atendendo às condições de diluição em que se trabalha, pode usar-se a lei de Henry

$$\kappa = \frac{C_s}{C_m}$$

Equação 3.1 – Definição da razão de partição.

Na equação 3.1, C_m é a concentração do componente no gás arrastador (fase móvel), κ é a razão de partição, inverso do coeficiente de partição da lei de Henry, e C_s é a concentração do componente na fase líquida estacionária.

Em cromatografia gás-líquido, a fase móvel é um gás inerte (gás arrastador ou de transporte) e a fase estacionária é um líquido de elevado peso molecular, depositado à superfície de pequeníssimas partículas finamente divididas (colunas de empacotamento) ou sobre as paredes de um longo e fino tubo aberto (colunas tubulares abertas ou colunas capilares). De uma forma geral, o gás arrastador é azoto, hélio ou hidrogénio comprimido em cilindros, botijas ou formado através de geradores, dependendo também do tipo de detector que se encontra no fim do sistema cromatográfico. As condições do fluxo gasoso são controladas por reguladores de pressão e válvulas de medição. A coluna é ligada ao sistema de injecção, onde a amostra é introduzida para o interior do sistema. A coluna está normalmente dentro de um forno de forma a seja possível seguir um programa de temperaturas que possibilitam controlar a separação. No final do sistema cromatográfico encontra-se um sistema de detecção contínuo do efluente da coluna (detector). O detector deve ser insensível ao gás arrastador mas responder aos componentes separados pela

coluna. Ligado a este detector encontra-se um sistema que faz o registo da resposta do detector em função do tempo (registador) e que constitui o cromatograma.

A figura 3.1 esquematiza os principais componentes de um cromatógrafo gás-líquido.

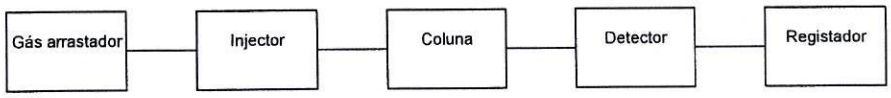


Figura 3.1 – Cromatógrafo gás-líquido

3.2.2 Definições básicas

O objectivo em qualquer processo cromatográfico é separar os componentes de uma mistura em compostos individuais. O tempo que as moléculas passam exclusivamente na fase móvel é equivalente ao tempo de retenção de uma substância que não sofra qualquer tipo de interacção com a fase estacionária, pois corresponde ao deslocamento no interior da coluna segundo o fluxo do gás arrastador. Este período corresponde ao tempo morto, T_m. Para além do tempo absoluto, necessário ao percurso livre, as moléculas encontram no seu caminho interacções com a fase estacionária pelo que são retardadas, e que vai exigir um tempo adicional T'_r. Assim, o tempo decorrido entre a entrada na coluna e a detecção à saída desta (que é o tempo de retenção total, T_r) é o resultante dos dois componentes (equação 3.2).

$$T_r = T_m + T'_r$$

Equação 3.2 – Definição do tempo de retenção total de uma espécie.

Na equação 3.2, T_r é o tempo de retenção total, T_m é o tempo morto e T'_r é o tempo de retenção ajustado. A figura 3.2 mostra como estes parâmetros se manifestam num cromatograma.

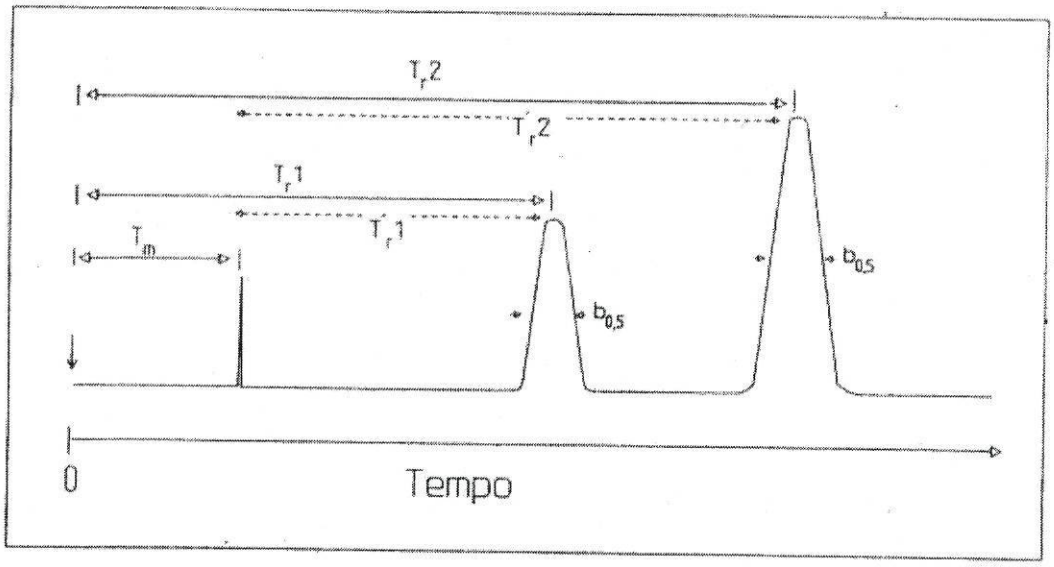


Figura 3.2 – Cromatograma e os parâmetros mais importantes [19]

A razão entre o tempo de retenção ajustado e o tempo morto representa uma grandeza relativa que traduz o quanto mais tempo um dado soluto passa na fase líquida do que um outro soluto. Esta grandeza tem o nome de razão de capacidade ou coeficiente de capacidade (equação 3.3).

$$k = \frac{T'_r}{T_m}$$

Equação 3.3 – Definição de coeficiente de capacidade

3.2.3 Mecanismo e eficiência da separação cromatográfica

Considere-se o mecanismo pelo qual um dado componente percorre uma coluna em cromatografia gás-líquido. No momento da introdução da amostra no sistema cromatográfico, se ela não for gasosa, é vaporizada e depois arrastada pela coluna com a ajuda do gás arrastador. Quando atinge a fase estacionária estabelece-se um equilíbrio entre a parte que fica nesta fase e a parte que fica na fase gasosa. Vai ser esta quantidade na fase de vapor que se vai deslocar e estabelecer um novo equilíbrio com a fase estacionária. Ao mesmo tempo que isto acontece, o gás arrastador puro atinge a fase estacionária e o componente que se encontrava na fase estacionária estabelece-se novo equilíbrio, sendo que parte reentra na fase gasosa. Assim,

o componente está progressivamente a deixar a fase gasosa e a passar para a fase estacionária na região frontal do componente no interior da coluna, enquanto está a deixar a fase estacionária e a passar para a fase de vapor na região da retaguarda. Este movimento do vapor é o mecanismo fundamental da cromatografia gasosa e resulta num movimento compacto da amostra através da fase estacionária.

A distribuição de vapor entre a fase estacionária (fase líquida) e a fase gasosa é descrita pela lei de Henry. A razão de partição é uma medida da distribuição de vapor entre as duas fases e é o inverso do coeficiente de partição. O valor desta constante determina a velocidade com que a zona de vapor passa através da fase estacionária. Assim, compostos que são preferencialmente absorvidos pela fase estacionária e que por consequência se movem lentamente através da coluna, têm uma razão de partição maior do que os compostos que não são prontamente absorvidos.

Se se introduzir numa coluna uma mistura de dois ou mais componentes, com coeficientes de partição bastante diferentes, eles atravessarão a coluna a velocidades diferentes e serão eluídos. Embora a separação dos componentes esteja relacionada, em primeiro lugar, com a razão dos seus coeficientes de partição, também depende da largura das bandas eluídas. A eficiência da separação pode definir-se, portanto, em termos da facilidade da coluna em separar uma dada amostra nos seus componentes de modo que sejam eluídos como bandas que não se sobreponham. A concentração de moléculas de soluto no efluente que emerge da coluna em função do tempo é, em condições ideais, uma curva do tipo gaussiano. A largura do pico é a consequência de vários factores relativos à coluna e não só. Os factores extra-coluna que contribuem mais para a dispersão do soluto são a largura da banda inicial e a existência de volumes mortos. A largura do pico reflecte a qualidade da coluna utilizada para a separação cromatográfica.

3.2.3.1 Número de pratos teóricos

Um parâmetro mais usual para medir a eficiência de colunas cromatográficas, por ser de cálculo fácil e directo a partir do cromatograma, é o conceito do número de pratos teóricos, representado por n. O parâmetro n traduz o valor da

dispersão dos tempos de retenção T_r para as moléculas de um dado soluto (equação 3.4)

$$n = \left[\frac{T_r^{\,2}}{\sigma}\right] = 16\left[\frac{T_r^{\,2}}{b}\right] = 5{,}54\left[\frac{T_r^{\,2}}{b_{0,5}}\right]$$

Equação 3.4 – Definição do número de pratos teóricos, em que b é a largura do pico na base e $b_{0,5}$ a largura do pico a meia altura.

O número de pratos teóricos depende do comprimento da coluna e traduz o alargamento relativo da banda durante o percurso cromatográfico. Para que esse valor reflicta apenas as interacções soluto-coluna, os cromatogramas que servem para o cálculo de n devem ser obtidos em condições isotérmicas. De modo a ser possível expressar a eficiência das colunas independentemente do seu comprimento, foi introduzido o termo altura equivalente do prato teórico, representado geralmente por h (equação 3.5).

$$h = \frac{L}{n}$$

Equação 3.5 – Definição de altura equivalente do prato teórico, em que L é o comprimento da coluna.

O valor de n e, consequentemente, o de h depende da posição no cromatograma do pico utilizado para a medição, isto é, do valor de k. Os picos que eluem mais cedo no cromatograma, apresentam um maior número de pratos teóricos. Este fenómeno é típico de colunas capilares onde, ao contrário do que acontece nas colunas de empacotamento, o tempo morto, que não contribui para a retenção, tem um peso relativo grande para os picos fracamente retidos. A fim de circular este inconveniente, foram introduzidas outras noções para definir a verdadeira eficiência de uma coluna. O conceito mais generalizado é o número de pratos teóricos efectivos N, calculado pela equação 3.6, após substituição de T_r por T'_r.

$$N = \left[\frac{T'_r{}^{2}}{\sigma}\right] = 16\left[\frac{T'_r{}^{2}}{b}\right] = 5{,}54\left[\frac{T'_r{}^{2}}{b_{0,5}}\right]$$

Equação 3.6 – Definição do número de pratos teóricos efectivos

Os valores de n e de N dependem da relação da capacidade k e encontram-se relacionados, como demonstra a equação 3.7.

$$N = n\left[\frac{k}{k+1}\right]^2$$

Equação 3.7 – Relação de n e N

A equação 3.7 reflecte a importância de k no cálculo de n. Quando k tende para o infinito, o termo $(k/k+1)^2$ tende para a unidade, isto é, a elevados valores de retenção, o número de pratos teóricos tende a igualar o número de pratos teóricos efectivos. Para valores de k superiores a 2, o valor de n muda muito pouco, o que leva a que n seja ainda o parâmetro mais popular na descrição da eficiência de colunas capilares.

3.2.3.2 A equação de Van Deemter

A velocidade linear do gás arrastador, u, é um parâmetro importante porque os gases são compressíveis e a medição dos fluxos em GC é realizada geralmente à saída da coluna e à temperatura ambiente, por processos volumétricos. O valor de u inclui a correcção para a compressibilidade do gás. A velocidade linear média é calculada a partir do comprimento da coluna e do tempo que um pico não retido demora a emergir da coluna, como mostra a equação 3.8.

$$u = \frac{L}{T_m}$$

Equação 3.8 – Definição da velocidade linear média

A variação da eficiência, expressa em termos da altura equivalente do prato teórico versus u, pode ser projectada graficamente. O estudo dos fenómenos de dispersão local que ocorrem numa coluna cromatográfica levou Van Deemter a propor uma equação capaz de descrever o processo em termos de parâmetros da coluna. A equação de Van Deemter para colunas de empacotamento contém, na sua forma simplificada, as constantes A, B e C relacionadas com os processos de natureza física que afectam a partição dos

compostos entre a fase móvel e a fase estacionária, como aparece na equação 3.9.

$$h = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

Equação 3.9 – Equação de Van Deemter

A constante A reflecte o efeito do caminho múltiplo. A constante B está relacionada com os fenómenos de difusão gasosa longitudinal e a constante C combina os efeitos de transferência de massa relacionados com a difusão na fase líquida e no suporte sólido.

3.2.3.3 Implicações dos conceitos teóricos

Na execução de uma análise cromatográfica, a resolução [19] e o tempo necessário à análise, assumem uma importância decisiva na escolha do método. O tempo de análise e a resolução estão relacionados com parâmetros operacionais e, naturalmente, com a natureza da própria coluna. A separação conseguida depende do comprimento e do diâmetro interno da coluna, da natureza da fase estacionária e espessura do filme, do tipo de gás arrastador e da sua velocidade linear média e da temperatura. O conhecimento de como estes parâmetros influenciam os resultados é indispensável à compreensão e desenvolvimento de um método analítico.

A temperatura tem um efeito decisivo na separação. Quanto mais baixa for a temperatura maior é a razão de partição k, o que significa um aumento do tempo que o componente passa na fase estacionária. Este facto permite aproveitar ao máximo as propriedades selectivas da fase estacionária, mas é bom notar que, em determinados tipos de fase líquida, a selectividade pode mudar com a temperatura e verificarem-se inversões da ordem de eluição.

A razão de fase pode ser mudada alterando a espessura do filme ou o diâmetro interno da coluna, influenciando assim o valor de partição. O tempo de análise pode ser diminuído encurtando a coluna. Naturalmente, o número de pratos teóricos diminui. Note-se que grande parte das separações que são efectuadas se realiza em condições de resolução muito superiores às efectivamente necessárias. Uma cuidada optimização das condições

operacionais podia encurtar o tempo de análise, mantendo uma resolução adequada à análise, como por exemplo, o encurtamento da coluna. Este facto traduz-se da maior importância em laboratórios em que são analisadas um grande número de amostras rotineiramente.

3.2.4 – Exemplos de cromatografia

Existem muitos tipos de classificação das técnicas cromatográficas, que se baseiam em critérios muito distintos, que vão desde a classificação baseada no tipo de coluna usada, até à classificação de acordo com os diferentes mecanismos de separação. Na figura 3.3 apresenta-se uma classificação dos vários tipos de sistemas cromatográficos, sugerida por Sewell e Clarke [22].

Natureza da fase móvel	Natureza da fase estacionária	Mecanismo de separação	Técnica	Nome do método cromatográfico
cromatografia gasosa	líquido	partição	coluna	Cromatografia gás liquido (GLC)
	sólido	adsorção	coluna	Cromatografia gás sólido (GSC)
cromatografia líquida	líquido	partição	coluna	Cromatografia líquida (LLC)
			planar	Cromatografia de camada fina (TLC)
	fase ligada líquida	partição modificada	coluna	Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)
			planar	Cromatografia líquida de alta pressão de camada fina (HPTLC)
	sólido	adsorção	coluna	Cromatografia líquido-sólido (LSC) Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)
			planar	Cromatografia de camada fina (TLC) Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) Cromatografia em papel (PC)
		permuta	coluna	Cromatografia iónica (IEC)
		exclusão	coluna	Cromatografia de exclusão (EC ou GPC)

Figura 3.3 – Classificação de sistemas cromatográficos. (as siglas entre parêntesis referem-se à designação inglesa).

A cromatografia gasosa (GC), à semelhança de outras técnicas cromatográficas, está associada a técnicas de detecção apropriadas e permite retirar informação qualitativa e quantitativa, em simultâneo, do sistema em estudo.

3.2.5 Equipamentos para Cromatografia Gás-líquido

Como já foi referido acima, as partes principais de um cromatógrafo gás-líquido são o sistema do gás arrastador, os dispositivos que controlam a pressão do gás, o injector, a coluna, o forno, o detector e o sistema de registo. Aborda-se agora com algum pormenor sobre alguns destes componentes de forma a ser possível conhecer melhor o processo cromatográfico no seu todo e não só relativamente à separação que ocorre na coluna.

O gás arrastador, que representa a fase móvel em GC é um componente essencial do sistema cromatográfico Gás-líquido mas de alguma forma limitante relativamente à separação propriamente dita. O gás arrastador é o meio pelo qual os constituintes da amostra se movem pelo interior da coluna e portanto o conjunto de escolhas possíveis é limitado. Por vezes, o gás tem algumas propriedades que podem complicar a análise a ser efectuada. Ao contrário da Cromatografia Líquida (em que existe uma grande variedade de composições possíveis para a fase móvel), pouco se pode ganhar em termos de separação alterando a composição da fase móvel em cromatografia gasosa. A escolha para gás arrastador é simples: azoto, hélio ou hidrogénio. Em alguns casos, como cromatógrafos portáteis, pode ser utilizado o ar mas é improvável em aparelhos de laboratório. Assim, a escolha entre azoto e hélio é feita atendendo à separação a realizar mas, em parte, atendendo também a questões económicas, já que o hélio é mais dispendioso. No entanto, se atendermos à eficiência da coluna em GC utilizando hélio como o gás arrastador ou azoto, a partir da equação de Van Deemter, podemos chegar à conclusão que os custos da utilização de hélio pode ser menor do que se for usado azoto, por análise de amostra [21]. A fonte habitual de gás utilizado em cromatografia, seja hélio ou azoto, são os cilindros de gás sob pressão. Existem no entanto outras alternativas, tais como geradores de gás. Seja qual for a fonte utilizada, deve ser dada atenção e cuidado especial à tubagem que

liga a fonte de gás e o aparelho, já que pode introduzir impurezas no fluxo gasoso. A maior parte das colunas não tolera bem humidade e oxigénio, principalmente se as condições em que opera incluam temperaturas superiores a 100º C. De forma a garantir maior longevidade da coluna e repetibilidade de separação, devem ser utilizados filtros para limpar o gás arrastador, podendo também introduzir filtros para remover hidrocarbonetos e oxigénio. Resumindo, o gás arrastador deve ser inerte para evitar quaisquer interacções (tanto com a amostra como com a fase estacionária), deve estar disponível facilmente e com pureza suficiente, económico quanto possível e adequado ao detector que está a ser utilizado.

Outra dificuldade em GC é a compressibilidade do gás arrastador e a sua subsequente influência na separação. Quando a temperatura aumenta para uma coluna com uma pressão constante na entrada de admissão do gás, a velocidade média na coluna vai diminuir devido ao aumento da viscosidade do gás da fase móvel de uma forma proporcional mas não linear. Sob estas condições, os fluxos podem diminuir a temperaturas mais elevadas e tanto a velocidade de separação como a própria eficiência podem ser diminuídas [21]. Os avanços em termos de instrumentação trouxeram a comercialização de equipamento capaz de fazer a programação de fluxos gasosos de uma forma bastante reprodutível.

Relativamente ao sistema de injecção, este nome aparece familiarizado já que a forma mais habitual da inserção da amostra num sistema cromatográfico é feita com a ajuda de uma seringa, através de uma válvula de injecção. No entanto não é a única forma da inserção da amostra ser realizada. O processo cromatográfico inicia-se com a introdução da amostra na coluna, que deve ser feita, idealmente, sem perturbar o fluxo dentro da coluna. Os resultados serão tanto mais reprodutíveis quanto este processo seja alcançado com o mínimo de alteração da pressão e do fluxo da fase móvel. Por outro lado, a injecção também cria a largura inicial do pico que é determinado no fim da coluna. Assim, a inserção da amostra na coluna deve ser feita de uma forma controlada, reprodutível e rápida. A forma mais usual de introduzir a amostra na coluna é feita com o uso de uma micro-seringa, em que a agulha penetra uma membrana plástica que veda o interior do sistema cromatográfico. A membrana deve selar o sistema cromatográfico tornando-o impermeável a gases,

tornando assim possível a deposição da amostra no início da coluna cromatográfica, que deve ser uma zona aquecida. Se a amostra for líquida ou sólida, ela é volatilizada e introduzida na coluna. No entanto, a membrana plástica desenvolve fugas e perde a sua elasticidade após alguma injecções, pelo que deve ser substituída. Outro problema que pode surge devido à utilização deste método é a introdução de impurezas na coluna provenientes da decomposição do septo ou desadsorção de alguns compostos que compõem o material plástico. Estes acontecimentos podem criar picos adicionais nos cromatogramas. Apesar dos avanços em cromatografia, alguns destes problemas devidos ao sistema de injecção por seringa ainda se mantêm. Outras formas de introdução de amostras no sistema cromatográfico são a partir de pirólise da amostra (que é especialmente útil para o caso de amostras sólidas), armadilhas que possibilitam a captura de compostos orgânicos voláteis (VOC's) e injectores adaptados a fibras de SPME. Este tipo de injector é de forma tubular, aberta e com temperatura regulável. Possui repartição regulável do fluxo de gás arrastador que passa pelo sistema de introdução da amostra para o interior da coluna. Como é adaptado a SPME, este tipo de injecção pretende tirar partido das características desse tipo de amostragem. Não existe um septo plástico mas sim um sistema que sela o interior do injector e se adapta à penetração da agulha de SPME para o seu interior. No interior do sistema de injecção passa um fluxo de gás arrastador que depois segue para o interior da coluna. Esse fluxo, em conjunto com a temperatura a que se encontra o sistema de injecção, vai ajudar à desadsorção dos compostos extraídos da amostra que se encontram à superfície da fibra e introduzi-los no interior da coluna. O sistema de repartição da amostra permite que apenas parte do fluxo gasoso que passa pelo injector seja introduzido na coluna. Assim, pode ser utilizado como uma forma de diluição da amostra mas também como uma forma de minimizar a introdução de impurezas do sistema.

A coluna é muitas vezes referida como o coração do sistema cromatográfico, já que é nela que ocorrem todos os fenómenos que conduzem à separação dos componentes da mistura introduzida no sistema. Normalmente existe sob a forma de um tubo, cujo comprimento varia entre alguns centímetros para uma coluna de cromatografia líquida e vários metros, para o caso de uma coluna capilar para cromatografia gasosa. As colunas têm geralmente um enchimento,

composto por pequenas partículas, tanto para o caso da LC e da GC. No entanto, nos últimos anos tem-se verificado um aumento do uso de colunas capilares em GC. Estas colunas são feitas de vidro ou sílica fundida, com diâmetros internos de 0,25 a 0,5 milímetros, tendo comprimentos de 20 a 100 metros. A superfície interna é normalmente desactivada (inerte), sendo posteriormente coberta com uma fase estacionária apropriada.

A coluna possui duas funções principais em qualquer processo cromatográfico: separar os solutos individuais da mistura e minimizar a dispersão das bandas dos solutos, que se querem tão estreitas quanto possível. A separação dos componentes da mistura é o resultado da selectividade das fases estacionária e móvel, existindo assim diferentes interacções moleculares dos solutos com as duas fases. Claro que as características de exclusão da fase estacionária também intervêm neste processo. Relativamente ao objectivo de minimizar o alargamento das bandas dos solutos, as colunas são desenhadas para o efeito. Quanto menor for a dispersão das bandas, melhor será a resolução e portanto maior será a eficiência da coluna, expressa através do número de pratos teóricos, como foi descrito acima. Os factores que afectam a eficiência de uma coluna são o comprimento e diâmetro interno desta, o tamanho das partículas que compõem o seu interior, a natureza das fases móvel e estacionária, a quantidade de fase estacionária presente, a temperatura a que a coluna se encontra, o enrolamento da coluna, o material que compõe a coluna, e também factores exteriores a esta, como a velocidade do gás arrastador ou a quantidade de amostra injectada.

A separação que ocorre na coluna é, na grande maioria dos casos, feita a temperatura controlada ou de acordo com um programa de temperaturas estabelecido. Para esse efeito utiliza-se um forno. Este é um componente importante do sistema cromatográfico mas que é muitas vezes negligenciado já que a sua função não tem requerido grandes avanços tecnológicos. No entanto, é ele que ajuda de uma maneira eficaz que a separação dos componentes se processe. Actualmente o intervalo de temperaturas utilizadas em cromatografia gasosa fica entre os 40 e os 350° C. Os fornos devem ser capazes de variar tão rapidamente quanto possível a sua temperatura e fazer

com que não existam gradientes de temperaturas no seu interior. Estes são os dois problemas que decorrem da utilização de fornos em cromatografia.

Finalmente temos os detectores e sistemas de registo de dados. O sistema de detecção é fundamental no sistema cromatográfico já que os resultados da separação realizada estarão perdidos se o sistema de detecção não realizar convenientemente a sua função de detectar os analitos, entretanto separados. O detector é então um dispositivo que revela a presença das substâncias eluídas à saída da coluna cromatográfica. Ele converte uma propriedade física num sinal mensurável, proporcionando informação sobre a magnitude da propriedade física medida. Ele compara essa propriedade entre o gás arrastador no estado puro e quando este transporta as substâncias eluídas previamente separadas na coluna. Esta acção traduz-se num sinal que depois será ampliado e tratado pelo registador ou integrador que existe acoplado ao detector. Existem diversos tipos de detectores para sistemas cromatográficos mas todos eles têm características comuns, que os tornam capazes de serem utilizados para o efeito. Deve ter uma capacidade de resposta rápida, ser insensível ao gás arrastador mas ter capacidade de detecção dos compostos a concentrações muito baixas, deve ser reprodutível mesmo trabalhando a concentrações baixas, deve ter uma razão sinal/ruído apreciável, deve ter resposta linear ao longo de um intervalo de concentrações razoável e capacidade de detecção de diferentes tipos de compostos distintos. Claro que nem todas estas características se encontram em todos os detectores disponíveis, já que existem sempre algumas limitações. Os detectores mais usados em cromatografia gasosa são:

- Detector de condutividade térmica: mede a condutividade térmica do gás arrastador, que vai sendo alterada consoante as substâncias que se encontram eluídas;
- Detector de ionização de chama: mede as variações da corrente de ionização de uma chama de oxigénio-hidrogénio;
- Detector de captura electrónica: baseia-se na electronegatividade das substâncias eluídas e a sua capacidade de formar iões negativos devido à captura de electrões;

- Detector de espectrometria de massa: baseia-se na determinação do espectro de massa em pequenos intervalos de tempo dos compostos que aparecem eluídos no gás arrastador.

Os dados recolhidos pelo detector têm depois de ser registados de alguma forma. Inicialmente eram utilizados sistemas de registo em papel dos sinais obtidos. Assim, ficavam registados os cromatogramas da análise efectuada. Com o aumento da capacidade de recolha de dados por parte do detector, principalmente quando se fala no detector de espectrometria de massa, a quantidade de informação que seria necessária registar não podia ser registada por esse tipo de registador. Este facto em conjunto com o desenvolvimento de sistemas informáticos baratos e acessíveis aos utilizadores fez com que os sistemas cromatográficos actuais privilegiem este tipo de suporte para registo de dados.

3.2.6 – Análise dos cromatogramas

Após ter sido traçado o cromatograma da experiência realizada, os dados obtidos são submetidos à análise do operador. De uma forma geral, os aspectos fundamentais a que se deve inicialmente ter atenção ao examinar um cromatograma são a linha de base, os picos cromatográficos, os tempos de retenção de cada pico, as áreas e alturas dos picos e a largura destes.

A análise do cromatograma pode ser feita do ponto de vista qualitativo ou quantitativo, ou ambos, se possível. Os processos a utilizar para a identificação dos picos cromatográficos pode ser dividida em duas categorias distintas: a identificação cromatográfica e a não cromatográfica. Relativamente à identificação cromatográfica, esta é feita a partir dos dados obtidos sobre a retenção dos compostos, utilizando se possível amostras padrão ou então amostras com concentração elevada de cada analito a estudar. Já a identificação não cromatográfica pode ser feita por análise de cada composto obtido e separado, por adição de padrão ou então utilizando técnicas auxiliares tais como espectroscopia Ultravioleta, Infravermelho, Ressonância Magnética ou Espectrometria de massa. Neste caso, estas técnicas podem ser acopladas ao sistema cromatográfico. Este assunto será tratado mais à frente.

A análise quantitativa de um cromatograma pode ser feita através da utilização de padrões internos ou externos, a adição de padrão ou então a calibração do sistema. Qualquer um destes métodos pode ser utilizado em apenas alguns casos. Será difícil estabelecer a priori um método ideal. No entanto, será sempre preciso decidir se são utilizadas as áreas ou as alturas dos picos obtidos. Relativamente à altura de um pico, este deve ser medido desde a linha de base até ao máximo deste. Este processo tem sido abandonado devido aos erros que pode acarretar, devido fundamentalmente a resolução deficiente do pico, variações da linha de base ou ao facto do pico ser extremamente pequeno. Em vez da altura dos picos, é normalmente preferido fazer a determinação da área de cada pico. Se bem que nos primeiros sistemas de registo, que utilizavam o registo em papel, este tipo de determinação era mais difícil do que a da altura do pico, a computorização dos equipamentos permite que este tipo de medição seja corrente, já que a integração é feita pela própria máquina.

3.3 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que se baseia no traçado do espectro de massa dos compostos no seu estado puro. Se uma substância pura é introduzida num sistema de vácuo, em que as moléculas podem mover-se livremente, estas podem ser excitadas através do fornecimento de energia até um ponto em que algumas ligações são quebradas, de forma a se tornarem mais estáveis. Deste modo são gerados fragmentos iónicos que se podem separar de acordo com a relação massa/carga (m/z), dando origem a um padrão bem definido do número de iões presentes por cada valor daquela relação. Esta distribuição é denominada por espectro de massa e é característica de uma determinada substância.

3.3.1 Introdução à Espectrometria de massa. O espectro de massa

Um espectro de massa consiste muito simplesmente num gráfico de barras cuja altura corresponde à abundância relativa dos iões mais abundantes definidos em função da relação m/z, expressa em percentagem normalizada ou em percentagem dos iões totais.

Quando uma molécula é bombardeada por um feixe de electrões, parte da energia é transferida para a molécula. Algumas destas moléculas excitadas tentam alcançar um estado mais estável através do rompimento das suas ligações. Assim formam-se iões de tamanho menor, que representam fragmentos da molécula original. Cada ião pode ser identificado pela razão massa/carga. A percentagem de iões que se formam para cada valor de m/z é característica de uma substância e por isso o gráfico com a abundância dos iões em função dos valores de m/z, o espectro de massa, são uma identificação da substância. Um caso particular dos fragmentos formados é o dos iões moleculares. Um número estatístico de moléculas que não absorvem energia suficiente para fragmentar, perde apenas um electrão, formando assim um ião-radical positivo, com a mesma massa da molécula original. A figura 3.4 mostra um espectro de massa do pesticida Vinclozolina.

O padrão segundo o qual a molécula se fragmenta pode ser interpretado de acordo com um conjunto de regras de modo a permitir a reconstrução da molécula com base na sua estrutura atómica. Os espectros que são produzidos através do impacto electrónico são reprodutíveis e únicos para a grande maioria das substâncias orgânicas, o que permite a criação de bases de dados informáticas de espectros de padrões conhecidos para comparar com os espectros obtidos experimentalmente e tentar identificar as substâncias que nos são desconhecidas.

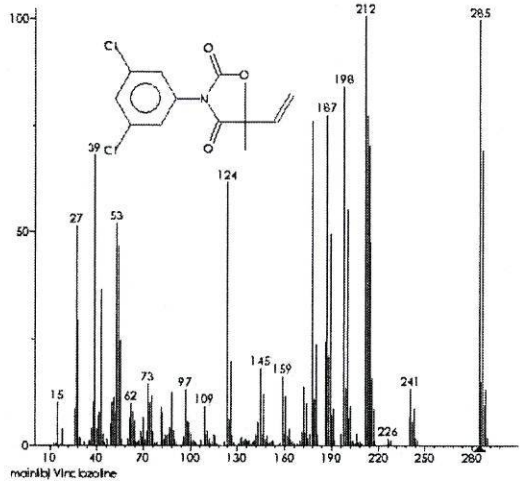


Figura 3.4 – Espectro de massa do Vinclozolina

3.3.2 Métodos usuais de ionização

Para que se possa formar um grupo de iões característicos de uma substância a partir da molécula original é necessário que forneça energia à molécula de modo a que se formem os iões. Existem vários processos para ionizar, mas será feita uma pequena e sumária descrição dos mais usuais: a ionização por impacto de electrões e ionização química.

No caso da ionização por impacto de electrões, as substâncias eluindo da coluna cromatográfica entram na câmara de ionização, que se encontra a uma pressão muito baixa. Nessa câmara existe um filamento incandescente que gera electrões, que são forçados a atravessar a câmara de ionização por acção de um eléctrodo com potencial positivo que, dependendo do aparelho, pode ser fixo ou variável. Quando uma substância é introduzida na câmara, aumenta a pressão tendo lugar colisões entre as moléculas da substância e os electrões, dando lugar à formação de iões positivos. A pressão a que se encontra a câmara tem uma importância enorme para que se obtenham espectros reprodutíveis, pois é necessário que não ocorram colisões entre moléculas da substância, o que alteraria o padrão de fragmentação e geraria espectros não reprodutíveis. A abundância relativa dos iões depende também da temperatura a que ocorre a ionização. A temperatura determina a magnitude das fragmentações e, consequentemente, a abundância relativa dos vários iões. Assim, será necessário ter em atenção quando se varia a temperatura de

ionização e se comparam os espectros obtidos nessas novas condições e os que existem na base de dados, que foram obtidos nas condições base.

Quando se tenta detectar compostos orgânicos com cadeias carbonadas longas por espectrometria de massa, utilizando a ionização por impacto electrónico, muitas vezes não é possível encontrar o ião molecular já que a fragmentação da molécula original é muito extensa. Assim, torna-se difícil determinar qual a massa do composto original e por isso identificar a substância. A utilização da ionização química significa uma ionização mais "suave", o que permite obter iões mais intensos mas à custa da informação estrutural que se obtém a partir da fragmentação. Neste tipo de ionização, um gás reagente é introduzido na fonte iónica a uma pressão relativamente elevada. As moléculas do gás são depois ionizadas por acção de um feixe de electrões, produzindo iões reagentes, que conduzem depois à ionização das moléculas do composto. Como o gás está presente em concentração elevada, não há uma ionização directa do composto de forma apreciável. Como as reacções entre o ião reagente e a molécula são de baixa energia (quando comparadas com as interacções electrão-molécula), obtêm-se espectros com iões moleculares e padrões de fragmentação muito simples. A natureza dos iões formados depende das condições em que foi obtido o espectro, nomeadamente a temperatura, a pressão, a calibração dos parâmetros experimentais, a pureza do gás reagente, o estado de limpeza da fonte iónica e o tipo de gás reagente utilizado. Dentro destes parâmetros, a temperatura influencia marcadamente o espectro obtido pelo que os espectros podem ser pouco reprodutíveis. No entanto, este tipo de ionização possui maior sensibilidade, sendo possível optimizar através da escolha bem ponderada do gás reagente a utilizar. Os gases mais utilizados na Ionização Química são o metano, propano, isobutano, amónia, água, hélio e dimetilamina.

3.3.3 Instrumentação

Um espectrómetro de massa é constituído por um conjunto de sub-unidades que permitem a produção de iões de massas diferentes, a sua separação, detecção, registo e obtenção de um gráfico de abundâncias relativas versus m/z. Estas sub-unidades são a fonte iónica, o analisador de massa, o detector

de iões, o amplificador de sinal, o sistema de vácuo e o sistema de controlo. O objectivo de um aparelho deste tipo é a identificação de um determinado composto.

Os espectrómetros de massa são habitualmente classificados de acordo com o método usado para levar a cabo a separação das massas iónicas. Os instrumentos normalmente utilizados em cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa agrupam-se em 3 tipos principais: instrumentos de quadrupolo, sector (simples e dupla focagem) e armadilha de iões ("Ion trap").

3.4 Cromatografia Gás-líquido acoplada a Espectrometria de massa. Técnicas hifenadas

Se os componentes de uma mistura, separados por cromatografia, forem introduzidos num espectrómetro de massa à medida que eluem da coluna e os seus espectros de massa registados, pode-se afirmar que o espectrómetro de massa se transforma num detector específico para cromatografia, uma vez que cada substância origina um sinal característico e único. Este é o princípio da técnica conhecida por cromatografia gás-líquido-espectrometria de massa ou GC-MS, segundo a designação em inglês (Gas chromatography – mass spectrometry).

3.4.1 Introdução às técnicas hifenadas

Chama-se técnica hifenada quando se duas ou mais técnicas são acopladas entre si de forma a operarem como um único aparelho. Os casos mais conhecidos estão por ventura relacionados com a cromatografia, isto porque em si a cromatografia não é uma técnica que permita a detecção, necessitando por isso de ter acoplada outra técnica que proceda à detecção e medição das propriedades em questão.

Os espectrómetros de massa têm vindo a ser usados como detectores para cromatografia em fase gasosa desde há mais de 30 anos. Esta associação, embora que pareça natural devido à complementaridade das técnicas, não foi

assim tão fácil de ser realizada. A união dos dois aparelhos tem de ser feita por meio de uma interface, que se torna assim bastante importante.

3.4.2 Interfaces

O problema de hifenar um cromatógrafo gás-líquido com um espectrómetro de massa deriva directamente das diferenças entre ambos no que concerne às exigências relacionadas com a dinâmica de fluidos em cada um deles. O cromatógrafo trabalha sob pressão enquanto o espectrómetro opera em vácuo. A ligação entre os dois, feita pela interface, deve conciliar as diferentes pressões dos dois sistemas. A interface ideal deve obedecer às seguintes condições:

- Permitir transferência total dos componentes eluídos para a câmara de ionização;
- Não introduzir volume morto, ou, por qualquer motivo, não contribuir para a largura de banda;
- Não interferir quimicamente com a amostra nem contribuir para a sua degradação;
- Não possuir locais activos;
- Não introduzir discriminação.

Vários tipos de interface são utilizados para o efeito, tendo como exemplos mais habituais a interface directa e a interface de divisor aberto.

3.4.3 Computorização e análise de dados

Os cromatógrafos não necessitam de sistemas muito avançados para funcionarem mas, de forma a serem capazes para efectuar análises mais complexas (como por exemplo de amostras alimentares, ambientais ou relativas a tecidos de seres vivos) será necessário acoplar equipamento sofisticado, que requer instrumentação avançada para o operar, nomeadamente através de computadores. Por outro lado, atendendo ao caso do GC-MS, se uma análise tivesse a duração de 30 minutos e fosse realizado um espectro de massa em cada segundo de análise, seriam traçados 1800 espectros de massa. Tal quantidade de informação só pode ser analisada e

guardada através de suporte informático, assim como a comparação dos espectros obtidos com os que estão na base de dados, para identificação de compostos. Assim, a utilização de computadores será a forma mais adequada para operar com um aparelho GC-MS, tanto em termos de controlo dos vários mecanismos do aparelho, como para o registo dos dados recolhidos por este, e posteriormente a avaliação dos resultados.

3.5 Microextracção em fase sólida [23,24,25,26,27]

A Microextracção em fase sólida (SPME, sigla relativa à expressão inglesa Solid-Phase Microextraction) é uma técnica de preparação de amostras relativamente recente, que não usa solventes. O princípio básico da sua abordagem é o uso de um pequeno volume de fase extractora, normalmente inferior a 1 µl. Os volumes das amostras podem ser bastante grandes, fundamentalmente quando a amostragem é realizada directamente no sistema a analisar, como por exemplo, o ar de uma sala ou a água de um lago. A fase extractora pode ser um líquido polimérico com elevado peso molecular, bastante semelhante às fases estacionárias utilizadas em cromatografia, ou pode ser um sorbente sólido, normalmente com elevada porosidade de forma a aumentar a área da superfície disponível para a adsorção.

A forma mais usual em que a SPME se apresenta hoje em dia é como uma fibra de sílica fundida, revestida por uma fase polimérica. Esta fibra está montada num sistema semelhante a uma seringa, em que pode ser exposta ao exterior (quando se pretende realizar uma amostragem) ou pode ser recolhida para o interior de um fino tubo metálico (quando não está em uso e para protecção do revestimento). Os analitos podem ser absorvidos ou adsorvidos pela fase estacionária, dependendo da natureza do revestimento, até que se alcance um estado de equilíbrio. A quantidade de analito extraída depende da constante de partição (ou constante de distribuição) do referido analito entre a matriz da amostra e o material de revestimento.

Em SPME os analitos não são extraídos quantitativamente da matriz. Contudo, os métodos de equilíbrio são mais selectivos já que tiram partido das

diferenças das constantes de partição dos analitos e dos interferentes. A extracção exaustiva dos analitos pode ser realizada se a constante de partição for suficientemente elevada. Neste tipo de extracção, a selectividade é sacrificada para obter uma transferência quantitativa dos analitos para a fase extractora. Assim, este tipo de abordagem não requer uma calibração do método porque todo o analito passou para a fase extractora. Quando a extracção exaustiva não é possível utilizam-se outras técnicas de determinação como, por exemplo, a calibração ou a adição de padrão.

3.5.1 Introdução às técnicas de extracção.

A extensão segundo a qual os solutos, tanto orgânicos como inorgânicos, se distribuem entre dois líquidos imiscíveis difere grandemente. Estas diferenças têm sido utilizadas durante décadas para obter separações analíticas. Este tipo de separação é denominado por extracção. Dois termos são utilizados para descrever a distribuição de um soluto entre dois solventes imiscíveis: o coeficiente de distribuição e a razão de distribuição.

Relativamente ao coeficiente de distribuição, este é uma constante de equilíbrio que descreve a distribuição das espécies do soluto entre dois solventes imiscíveis. Por exemplo, quando uma solução aquosa de um soluto orgânico A é agitada na presença de um solvente orgânico, tal como o hexano, estabelece-se rapidamente um equilíbrio:

$$A_{(aq)} \leftrightarrow A_{(org)}$$

Numa situação ideal, a razão das actividades da espécie A nas duas fases é constante e independente da quantidade total de A (equação 3.10). No entanto é dependente da temperatura.

$$K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

Equação 3.10 – Definição do coeficiente de distribuição K_d, para uma dada temperatura

Os termos utilizados na equação 3.10 que estão entre parêntesis rectos referem-se estritamente às actividades da espécie A nos dois solventes, sendo

muitas vezes substituídos por concentrações molares sem que o erro seja grosseiro.

Quando o soluto existe em estados de agregação diferenciados nos dois solventes, a equação relativa ao equilíbrio torna-se:

$$xA_{y(aq)} \leftrightarrow yA_{x(org)}$$

A equação 3.11 mostra o coeficiente de distribuição para este caso.

$$K_d = \frac{[A_x]^y_{org}}{[A_y]^x_{aq}}$$

Equação 3.11 – Definição do coeficiente de distribuição K_d

Relativamente à razão de distribuição de um analito, esta é definida como a razão das concentrações analíticas nos solventes imiscíveis. Para um sistema simples, como o descrito acima (A distribuído entre as duas fases, sem ocorrência de agregação), a razão de distribuição é idêntica ao coeficiente de distribuição. Em sistemas mais complexos, as duas expressões são bastante diferentes. Por exemplo, para a distribuição de um ácido gordo HA entre água e éter dietílico, pode-se escrever a razão de distribuição como figura na equação 3.12.

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

Equação 3.12 – Definição da razão de distribuição

Em meio aquoso, a concentração analítica de um ácido é igual à soma das concentrações de equilíbrio do ácido fraco e da sua base conjugada. Contrastando com este caso, não ocorre uma dissociação significativa do ácido na camada orgânica não-polar, e por isso as concentrações analíticas e de equilíbrio de HA são idênticas. Desta forma, a equação 3.13 traduz a razão de distribuição quando se introduz estes factos.

$$D = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq} + [A^-]_{aq}}$$

Equação 3.13 – Razão de distribuição de HA

A equação 3.14 mostra a forma de relacionar D com a constante de acidez de HA, K_a, a partir das equações 3.13 e 3.11.

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} = K_d \times \frac{\left[H_3O^+\right]_{aq}}{\left[H_3O^+\right]_{org} + K_a}$$

Equação 3.14 – Relação entre D e K_d para HA

A equação 3.14 pode ser utilizada para calcular a extensão da extracção de HA em soluções aquosas tamponadas. De notar novamente que, o coeficiente de distribuição é a razão das concentrações molares da espécie e que a razão de distribuição é a razão das concentrações analíticas molares da espécie.

Os coeficientes de distribuição e as razões de distribuição são bastante úteis porque podem servir como guias para executar separações por extracção de uma forma mais eficiente. Por exemplo, considerando a extracção da espécie HA, novamente, de uma solução aquosa com pH = 2,00, em que se possa aplicar a equação 3.12. Supondo que V_{aq} contém a_0 milimoles de HA e que é extraído com V_{org} mililitros de éter dietílico. No equilíbrio, permanecem a_1 milimoles de HA na camada aquosa e (a_0-a_1) milimoles foram extraídas para a camada orgânica. Utilizando a equação 3.12 em conjunto com as concentrações analíticas da espécie em cada camada e rearranjando a equação de forma a termos a expressão relativa a n extracções, temos a equação 3.15, que define o número de milimoles de HA presente na camada aquosa.

$$a_n = \left(\frac{V_{aq}}{V_{org}D + V_{aq}}\right)^n a_0$$

Equação 3.15 – Definição da concentração de HA na fase aquosa após n extracções

A equação pode, finalmente, ser reescrita em termos das concentrações analíticas inicial e final de HA na água, tal como expressa a equação 3.16.

$$\left(C_{aq}\right)_n = \left(\frac{V_{aq}}{V_{org}D + V_{aq}}\right)^n \left(C_{aq}\right)_0$$

Equação 3.16 – Definição da concentração de HA na fase aquosa após n extracções, reescrita

Da equação 3.16 retira-se que se obtém uma extracção mais eficiente utilizando vários volumes pequenos de solvente do que um volume único grande.

Os tipos de extracção que são baseados no equilíbrio de distribuição entre solventes imiscíveis são 3: simples, exaustivo e extracção contra-corrente. As extracções simples são as mais comuns, e são realizadas normalmente em funis de extracção. Um exemplo de extracção exaustiva é a extracção Soxhlet. Já no caso das extracções em contra-corrente, estas são normalmente realizadas em equipamentos automatizados.

3.5.2 Descrição da SPME

A SPME é uma técnica em que os processos de extracção e de pré-concentração ocorrem a uma micro escala. O dispositivo base da SPME consiste numa fibra de sílica fundida em que 10 mm de uma extremidade se encontram cobertos por um filme fino de polímero (por exemplo, Polidimetilsiloxano, PDMS) ou de um sólido adsorvente (micro partículas de carvão activado, por exemplo, Carboxen). As espessuras dos revestimentos disponíveis comercialmente variam entre 7 e 100 µm, variando portanto o seu volume. A natureza do revestimento também varia, alterando portanto as capacidades extractivas, tanto em termos de extensão da extracção como das substâncias extraíveis. A extracção ocorre com a exposição da parte com revestimento da fibra à amostra, tanto por imersão na amostra como pela exposição ao seu "headspace" (fase de vapor da amostra). De seguida mostra-se algumas vantagens de usar uma extracção em escala tão pequena. Imagine-se uma gotícula de 1 µl de solvente orgânico, colocada em 10 ml de uma matriz aquosa com analitos orgânicos. Esta gotícula representaria um décimo milésimo do volume da matriz. Por afinidade, analitos orgânicos migrariam da matriz para a gotícula de solvente, onde seriam concentrados de acordo com os seus coeficientes de partição, ou distribuição, entre o solvente orgânico e a matriz aquosa. Para fins quantitativos, depois de saturada com os analitos, a gotícula teria de ser retirada intacta do seio da matriz (onde ela deveria ser imiscível, mesmo sob agitação) e injectada para um cromatógrafo gás-líquido, por exemplo. O volume da gota e o nível de concentração dos

analitos resultariam num cromatograma, no qual a sobreposição dos picos relativos aos analitos em relação à cauda do pico do solvente não comprometeria a análise quantitativa. Este tipo de escala apresenta mais uma vantagem adicional: como, comparativamente à matriz, em cada gota haveria pouco analito, as pequenas quantidades extraídas não descaracterizariam as concentrações respectivas na matriz. Portanto, poderiam ser realizadas outras extracções na mesma matriz, dispondo assim de réplicas estatisticamente aceitáveis e reprodutíveis. No entanto, a manipulação de um volume tão pequeno torna este tipo de procedimento acima descrito inviável. No caso da SPME, o revestimento da fibra age de uma forma semelhante à pequena gotícula do exemplo só que permanece imobilizada na fibra de sílica, contornando a maior parte dos problemas práticos que o procedimento descrito traria. No entanto, os restantes aspectos da SPME relativos a outros métodos de extracção convencionais são mantidos.

A amostragem por SPME pode ser realizada através de 3 formas distintas: extracção directa, extracção no headspace e extracção com protecção por membrana.

Na extracção directa, a fibra revestida é introduzida na amostra e os analitos são transportados directamente da matriz da amostra para o material de revestimento. Se a amostra for líquida, pode-se falar em amostragem por imersão. Neste caso, e para facilitar o processo de extracção, deve-se promover a agitação da amostra de forma que os analitos se desloquem mais rapidamente do seio da amostra para a vizinhança da fibra.

No caso da extracção no headspace, os analitos são extraídos da fase gasosa, que está em equilíbrio com a amostra. As razões principais para este tipo de amostragem devem-se às interferências que a matriz pode induzir no processo de extracção e à protecção da fibra relativamente a substâncias de elevado peso molecular existentes na matriz. Esta forma de amostragem permite a introdução de algumas alterações da matriz, como o ajuste do pH, sem que isso afecte a extracção. Num sistema que consista numa amostra líquida e o seu headspace, a quantidade de analito extraída pelo revestimento da fibra não depende da localização da fibra (como se demonstrará posteriormente) na fase líquida ou na fase de vapor e, portanto, a sensibilidade de amostragem no headspace é semelhante à da amostragem directa, desde

que os volumes das duas fases permaneçam iguais nos dois tipos de extracção.

Uma grande diferença entre estes dois modos de extracção reside na cinética. Quando a fibra se encontra no headspace, os analitos são removidos inicialmente do headspace, seguido da extracção indirecta da matriz. Assim, os analitos voláteis são extraídos mais rapidamente que os semi-voláteis. A temperatura tem um efeito significativo na cinética do processo já que determina a pressão de vapor das substâncias. De uma forma geral, o tempo para alcançar o equilíbrio para compostos voláteis é mais curto para a extracção SPME no headspace do que por extracção directa, sob as mesmas condições de agitação, devido a 3 razões: uma porção substancial dos analitos está presente no headspace antes do início do processo de extracção; existe normalmente uma interface significativa entre a matriz da amostra e a fase gasosa e os coeficientes de difusão na fase gasosa são bastante mais elevados do que na fase líquida, de uma forma geral. Se a agitação da amostra for suficientemente rápida, esta última terá a tendência de se deslocar para perto das paredes do vaso em que se encontra, provocando que a interface entre o líquido e a fase de vapor passe de uma superfície plana para uma forma cónica (formando então um "vortex"), o que leva a um aumento da superfície da respectiva interface, facilitando a passagem do analito da amostra para o headspace. No caso dos compostos semi-voláteis, onde se incluem a grande maioria dos pesticidas, a concentração na fase de vapor é relativamente pequena, afectando por isso a extracção no headspace. No entanto, esta pode ser melhorada através do aumento da temperatura e da agitação da amostra.

A extracção SPME com protecção por membrana a fibra encontra-se separada da amostra por uma membrana selectiva que é, idealmente, permeável aos analitos mas que bloqueia a passagens dos interferentes. O objectivo principal desta forma de extracção consiste na protecção da fibra relativamente a compostos existentes na amostra. Este método de extracção é substancialmente mais lento que a extracção directa já que os analitos têm de ultrapassar a membrana antes de chegarem perto do revestimento. O uso de membranas finas e o aumento da temperatura de extracção podem resultar numa diminuição dos tempos de extracção.

Após ter sido realizada a extracção, a fibra é retirada do contacto com a amostra (é recolhida para dentro de um tubo em forma de agulha), sendo submetida depois à técnica analítica que se pretende usar. Este tipo de fibra é frequentemente usado para GC, sendo que também já se encontram disponíveis versões para cromatografia líquida. Tomando como exemplo a utilização em GC, a fibra após a extracção seria introduzida no injector do aparelho, onde os analitos são termicamente desadsorvidos, sob um fluxo de gás que os introduz na coluna de separação. Como o revestimento da fibra é bastante pequeno e as quantidades de analitos extraídos também serão diminutas, a desadsorção e a separação cromatográfica são facilitadas.

A SPME tem então a capacidade de realizar as primeiras etapas do processo analítico: amostragem, preparação da amostra e a introdução da amostra no instrumento analítico.

3.5.3 Fundamentos da teoria de SPME

Numa extracção por SPME, as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no revestimento, vencendo para tal as resistências da transferência de massa até que se estabeleça de partição do analito entre a fibra e o meio em seu redor, isto se a análise foi realizada em condições de equilíbrio. Daqui se conclui que a teoria da SPME se baseia na cinética da transferência de massa entre as fases em jogo e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. A parte teórica aqui descrita é apresentada de uma forma abreviada, devido à extensão desta e também porque não cabe a este texto a exploração intensiva de toda a teoria da técnica.

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas de várias fases. Um sistema trifásico ideal simples é o de uma fibra mergulhada numa matriz aquosa com um headspace. Os sistemas reais são bastante mais complexos já que o headspace e a matriz não são soluções ideais, os analitos podem reagir entre si ou podem interagir com as paredes do frasco. Os fundamentos da distribuição de massas podem ser descritos a partir do que ocorreria num sistema ideal de três fases: antes da extracção se realizar, estão presentes n_0 moles do analito, num volume V_m (da matriz) e portanto numa

concentração C_0. Quando a extracção está terminada (e supondo que se atingiu o equilíbrio), as n_0 moles distribuíram-se pelas várias fases, isto é, n^e_m na matriz aquosa (o expoente ^{e} é relativo a equilíbrio), n^e_h no headspace e n^e_f na fibra. A equação 3.17 mostra a conservação da massa no processo.

$$n_0 = n^e_m + n^e_h + n^e_f$$

Equação 3.17 – Equação de conservação da massa do analito na extracção por SPME

Por outro lado, a equação 3.18 mostra a relação entre as constantes de distribuição fibra-matriz (K_{fm}), fibra-headspace (K_{fh}) e headspace-matriz (K_{hm}). Esta equação foi obtida a partir da equação 3.17, sendo que $K_{xy} = C^e_x/C^e_y$.

$$K_{fm} = K_{fh} \times K_{hm}$$

Equação 3.18 – Relação entre constantes de distribuição

Após a substituição das constantes de distribuição e da equação 3.18 na equação 3.17, efectuado rearranjos, obtém-se a equação 3.19, que define a quantidade de analito extraído no sistema em equilíbrio.

$$n^e_f = \frac{K_{fm} V_f C_0 V_m}{K_{fm} V_f + K_{hm} V_h + V_m}$$

Equação 3.19 – Definição da quantidade de analito extraído num sistema em equilíbrio

A equação 3.19 relaciona a quantidade extraída do analito com os parâmetros fundamentais dos equilíbrios simultâneos e descreve o aspecto termodinâmico da SPME. Esta equação mostra que, como seria de esperar, que a quantidade de analito extraído é independente da localização da fibra no sistema. Pode ser colocada no headspace ou directamente na amostra, desde que os volumes do revestimento, do headspace e da amostra permaneçam constantes. Existem 3 termos no denominador da equação 3.19 que representam uma medida da capacidade em cada uma das fases: fibra ($K_{fm}V_f$), headspace ($K_{hm}V_h$) e da amostra (V_m). Se assumirmos que o vaso que contém a amostra se encontra completamente cheio (isto é, sem headspace), o termo $K_{hm}V_h$ pode ser eliminado, resultado na equação 3.20.

$$n^e{}_f = \frac{K_{fm} V_f C_0 V_m}{K_{fm} V_f + V_m}$$

Equação 3.20 – Definição da quantidade de analito extraído num sistema em equilíbrio, sem headspace

Esta equação descreve a massa absorvida pelo revestimento polimérico, depois do equilíbrio ter sido alcançado. Na generalidade das determinações K_{fm} é relativamente pequeno quando comparado com a razão dos volumes das fases da matriz e da amostra e do revestimento ($V_f << V_m$). Nesta situação, o teor na amostra é muito maior do que a na fibra, resultando na relação expressa pela equação 3.21.

$$n = K_{fm} V_f C_0$$

Equação 3.21 – Relação da quantidade de analito extraído num sistema em equilíbrio, sem headspace, quando $V_f << V_m$

A equação enfatiza a capacidade de amostragem da SPME. Não é necessário que a amostra tenha um volume constante já que a quantidade de analito extraída é independente do volume da amostra, V_m, desde que a relação $K_{fm}V_f << V_m$ seja verdadeira. Assim, um dispositivo SPME pode ser colocado em contacto directo com o sistema a ser investigado, permitindo a quantificação.

A discussão desenvolvida acima é limitada a equilíbrios envolvendo fases poliméricas, como PDMS. O método de análise para revestimentos sólidos sorbentes é análogo para baixas concentrações de analitos, já que a área total da superfície disponível para a adsorção é proporcional ao volume de revestimento, se assumirmos que a porosidade do sorbente é constante. Para concentrações mais elevadas de analito, pode ocorrer a saturação da superfície resultando em isotérmicas não-lineares.

Contudo, a equação 3.19 não engloba o intervalo de tempo necessário para que o equilíbrio seja alcançado. Este intervalo de tempo, que é fundamental do ponto de vista experimental, depende das dificuldades de transferência de massa no sistema.

Relativamente à cinética em SPME, a equação 3.20 relaciona o tempo necessário para atingir o equilíbrio, t_e, em função da espessura do revestimento (L_f) e do coeficiente de difusão do soluto nessa camada (D_f).

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_f^{\,2}}{2D_f}$$

Equação 3.20 – Definição do tempo necessário para atingir o equilíbrio

Segundo a equação 3.20, o tempo necessário para atingir o equilíbrio seria infinito mas, devido às incertezas experimentais inerentes às extracções por SPME, considera-se um tempo de equilíbrio correspondente à extracção de 95% da massa que seria extraída após um tempo infinito de extracção (t_{95}). A adequação da equação 3.20 a resultados experimentais deve ser realizada com cautela. Se, por exemplo, utilizarmos uma fibra comercial com revestimento PDMS (L_f=100 mm) para o benzeno (D_f=2,8 × 10^{-6} $cm.s^{-1}$), o valor previsto de t_{95} seria de, aproximadamente, 20 segundos [24]. Na prática, só se a extracção for feita na fase gasosa é que o valor obtido experimentalmente estará próximo do previsto [24]. Se a extracção for realizada numa matriz aquosa, o valor seria próximo dos 200 segundos, já que teria de se considerar o tempo necessário para que o analito se deslocasse através da matriz até à superfície da fibra.

Na figura 3.5 temos 5 curvas de extracção do benzeno com a fibra PDMS referida [24]. A curva A é uma representação teórica da expressão 3.20. As restantes curvas foram obtidas experimentalmente, com vários níveis de agitação. Dessa figura ressalta o facto do valor de t_e diminuir com o aumento da agitação da matriz. Este facto explica-se porque a difusão do analito é melhorada em termos de velocidade do deslocamento até à fibra. De qualquer forma, em todos os casos, o valor de t_e obtido é inferior ao previsto pela expressão 3.20.

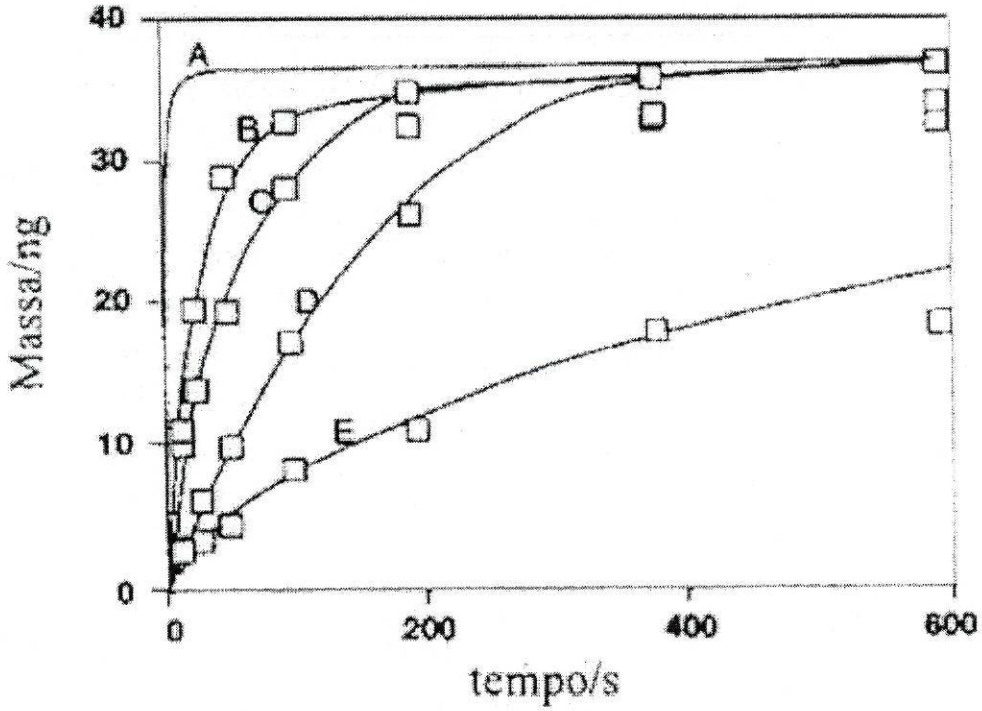


Figura 3.4 – Perfis de extracção para 1 ppm de benzeno em água. [24]

(A) De acordo com a equação 3.20 (usando K_{fm} = 125, D_f = 2,8 x 10^{-6} cm s^{-1} e D_m = 1,08 x 10^{-5}cm s^{-1}), sob três condições de agitação: (B) agitação magnética a 2500 rpm, (C) 1800 rpm, (D) 400 rpm e (E) sem agitação. Agitador magnético de 7 mm de comprimento, frasco de 7,4 ml, fibra de L_f = 0,56 mm posicionada no centro do frasco.

Um facto a acrescentar ao acima referido, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é superior ao previsto porque, apesar da agitação, a superfície da fibra fica em contacto com uma camada estática da matriz, de espessura δ. Ao contrário do que ocorre na região com agitação, na camada estática a transferência de massa ocorre exclusivamente por difusão, sendo assim mais lenta [24]. A equação 3.21 mostra os factores responsáveis pelo aumento do t_e. Aplicando-a à extracção do benzeno em solução aquosa obtemos uma previsão de 190 segundos [24], que é um valor próximo do representado na figura 3.5.

$$t_e \approx t_{95} = 3\delta \frac{K_{fm} L_f}{D_m}$$

Equação 3.21 – Definição do tempo necessário para atingir o equilíbrio, introduzindo alguns factores anteriormente desprezados

A equação 3.21 implica algumas considerações importantes a nível experimental: o tempo para atingir o equilíbrio é mais dependente da difusão do soluto na camada aquosa estacionária (D_m) do que na fibra e as extracções mais rápidas são melhor realizadas com fibras de revestimentos mais finos. No entanto, a utilização de fibras com revestimento mais fino leva a que a quantidade de analitos extraídos seja menor, o que pode limitar a sensibilidade analítica.

Se utilizarmos a SPME para extracções em headspace, teremos de fazer outra linha de raciocínio. Neste tipo de extracções, a transferência de massa num sistema trifásico fibra-headspace-matriz depende dos equilíbrios de partição entre as três fases, das dimensões das fases e dos coeficientes de difusão de soluto nelas. A equação 3.22 descreve a relação entre estes factores e o tempo de equilíbrio, para um sistema sem agitação.

$$t_e \approx t_{95} = 1{,}8\left(\frac{L_h}{K_{hm}} + \frac{L_m}{1{,}6 D_m} \right) K_{fm} L_f$$

Equação 3.22 – Definição do tempo necessário para atingir o equilíbrio, num sistema trifásico fibra-headspace-matriz, sem agitação

Segundo a equação, deve-se minimizar as espessuras de todos os componentes (L_m, L_h e L_f, respectivamente). No entanto, a minimização destes componentes é problemática já que podem afectar a sensibilidade do método (L_m) ou até afectar a termodinâmica da extracção caso as concentrações do analito variem excessivamente no headspace e na matriz (L_m e L_h) [24]. As limitações que decorrem dos coeficientes de difusão podem ser contornados através de agitação e/ou aquecimento. Quanto às limitações das constantes de distribuição, deve-se procurar um compromisso entre estas, sendo é ideal a situação de K_{hm} ser elevado e K_{fh} pequeno (o equilíbrio é atingido de uma forma rápida e a concentração do analito na fibra é pequena em relação à amostra).

3.5.4 Desenvolvimento de um método em SPME

A SPME elimina a necessidade do uso de solventes ou equipamento complexo para realizar uma extracção. Apresenta até diversas vantagens relativamente aos métodos habituais de extracção, como a extracção líquido-líquido ou a extracção em fase sólida. Os analistas que não estão familiarizados com a SPME exprimem preocupação relativamente à consistência dos resultados e à capacidade de detecção de pequenas concentrações dos analitos.

Para que se possa desenvolver um método em SPME, de uma forma objectiva, algumas etapas devem ser bem delineadas. Esta pequena secção serve para enumerar alguns aspectos experimentais com os quais devemos ter cuidado, para que seja possível optimizar um método de SPME.

Os parâmetros seguintes são importantes em SPME e por isso devem ser bem estudados e controlados para que os resultados sejam reprodutíveis:

- O revestimento da fibra: A natureza química dos analitos a analisar determina o tipo de revestimento usado. A regra básica "semelhante dissolve semelhante" aplica-se perfeitamente aos revestimentos líquidos. A selecção do revestimento deve ser baseada principalmente na polaridade e volatilidade dos analitos. O revestimento de PDMS é o mais usual e é o que se deve considerar em primeiro lugar. É bastante robusto e pode ser utilizado até temperaturas de 300º C. É uma fase líquida não-polar e, portanto, extrai as substâncias não-polares num largo intervalo de concentrações. Pode ser utilizado também para compostos polares desde que as condições experimentais sejam optimizadas.

- A espessura do revestimento: Em conjunto com a constante de distribuição dos compostos, a espessura do revestimento determina a sensibilidade do método e o tempo de extracção. Revestimentos espessos são capazes de possuir uma sensibilidade superior mas necessitam de tempos de equilíbrio mais longos.

- A selecção de um reagente derivatizante: Pode ser realizada antes e/ou durante a extracção de forma a melhorar a sensibilidade e selectividade da extracção e detecção, assim como permitir a determinação de analitos que não são extraídos directamente por SPME. Este processo complica a extracção por

SPME e por isso só deve considerado se for necessário. A derivatização é usada geralmente para a análise de amostras complexas.

- A selecção do método de extracção: Deve ser baseada na composição da matriz da amostra, na volatilidade do analito e da respectiva afinidade com a matriz. Para amostras complexas, deve-se usar extracção no headspace ou com protecção com membrana. Para amostras mais simples, pode-se ainda optar pela extracção directa. Para analitos com volatilidade média ou elevada deve-se preferir a extracção por headspace, como explicado anteriormente.

- O volume da amostra: A sensibilidade de um método de SPME é proporcional ao número de moles de analito extraídas da amostra e, para a extracção directa, dada pela equação 3.20. Com o aumento do volume da amostra, a quantidade do analito extraída também aumenta até que o volume da amostra se torne maior que o produto da constante de distribuição pelo volume do revestimento.

- O pH do meio: A alteração das condições da amostra poderá permitir a extracção de compostos que dificilmente seriam extraídos. Um das características que são geralmente alteradas é o pH do meio. Com a sua alteração, pretende-se facilitar a extracção dos analitos.

- A força iónica do meio: A variação da força iónica da amostra pretende ajustar a solubilidade dos analitos na amostra, já que a solubilidade depende da força iónica. Assim, aumentando a força iónica do meio pode-se, de uma forma geral, diminuir a solubilidade dos compostos na amostra, o que facilita a passagem destes para a fase de vapor. O aumento da força iónica do meio é normalmente promovido com a adição de um sal.

- A agitação da amostra: A extracção em amostras líquidas deve ser realizada com agitação da amostra de forma a facilitar o transporte de massa desde o seio da solução até à fibra. A forma mais comum de se realizar este processo é através da agitação magnética. Neste caso, deve-se ter cuidado para que a velocidade de rotação seja constante e que a superfície do agitador magnético não altere a temperatura, o que poderia provocar a variação da temperatura da amostra. Por outro lado, o uso de barrinhas magnéticas pode provocar problemas devidos a contaminação cruzada entre amostras. No entanto, se os cuidados devidos forem tomados, a agitação magnética é bastante eficiente.

- Selecção das técnicas de separação e detecção: Apesar da maioria dos métodos desenvolvidos com SPME se aplicar a cromatografia gasosa, têm vindo a ser introduzidas noutras técnicas como a Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ou a Electroforese capilar. Especial atenção deve ser dada à etapa de desadsorção dos analitos já que as fibras devem estar adaptadas ao sistema analítico. Podem ser utilizados os detectores habituais de qualquer uma destas técnicas de separação.

- Condições de extracção: A temperatura e o tempo de extracção são factores cruciais na extracção por SPME. Como já foi explicado, o aumento da temperatura de extracção favorece a passagem dos analitos para a fase de vapor, o que facilita a extracção. No entanto, se a temperatura foi demasiado elevada, pode favorecer a desadsorção dos analitos (o que seria contrário ao propósito da extracção) ou até alterar propriedades da amostra ou do analito. Relativamente ao tempo de extracção, se não for utilizado o tempo de alcançar o equilíbrio, este deverá ser controlado com todo o cuidado de forma a obter ensaios reprodutíveis.

- Condições de desadsorção: A temperatura de desadsorção e o período de tempo durante o qual esta decorre são parâmetros importantes num método de SPME. A temperatura determina quais os analitos que são "libertados" pelo revestimento, para o interior do sistema analítico. O ideal seria que todas as substâncias adsorvidas fossem libertadas. No entanto as fibras não podem ser submetidas a temperaturas demasiado elevadas e durante muito tempo pois o revestimento será afectado, diminuindo as suas capacidades de extracção. Assim, a fibra deve ser submetida a uma temperatura suficientemente elevada de forma a libertar os compostos mas que não coloque em risco a sua integridade. Relativamente ao tempo de desadsorção, deve ser suficientemente longo para libertar todos os compostos, ficando assim a fibra "limpa", mas não deverá exceder esse tempo pois provocará um desgaste desnecessário ao revestimento.

Todos os aspectos referidos acima são considerados importantes para um método de SPME. No entanto, as considerações efectuadas terão sempre de ser comprovadas já que nem sempre os sistemas se comportam da mesma forma.

3.5.5 Aplicação da SPME à análise de pesticidas

É opinião geral que é necessário o uso continuado de pesticidas para a produção de alimentos que satisfaçam a população mundial, que se encontra permanentemente a aumentar. No entanto, a indústria não ignora os riscos que são atribuídos à utilização desses produtos e por isso gera uma grande quantidade de dados e informações para uma utilização segura dos pesticidas. Por outro lado, cria também metodologias que permitam a monitorização dos pesticidas no meio ambiente, tal como é requerido pelos organismos públicos reguladores.

Várias metodologias, utilizando as mais diversas técnicas, vão sendo propostas por investigadores para a quantificação de concentrações vestigiais de pesticidas e dos metabolitos que estes geram. Alguns dos procedimentos habituais para este tipo de análise usam grandes volumes de solventes orgânicos e consomem bastante tempo. Ora, a utilização de solventes orgânicos implica a exposição do analista a diversos riscos, além de produzir um impacto negativo no ambiente, já que será necessário o tratamento desses solventes. Assim, a análise de pesticidas é um desafio permanente para a Química Analítica. A procura de um método que seja rápido, exacto e que não produza problemas tanto de cariz ambiental como de segurança para o operador. A SPME surge então como uma hipótese viável para este tipo de análise e tem sido aplicada para resolver problemas dessa índole, apresentando também um custo relativamente baixo, que é sempre favorável. As principais vantagens são o facto de ser uma técnica que não requer o uso de solventes orgânicos e que é capaz de ter limites de detecção relativamente baixos para diversos analitos. Uma outra vantagem é que pode ser automatizada, pelo que seria possível retirar a intervenção do operador.

Existem dois tipos de métodos para a detecção múltipla de pesticidas: aqueles que detectam simultaneamente mais que um pesticida e que estes têm um parentesco químico entre si, e os que detectam várias classes de pesticidas. O primeiro caso apontado implica que o método seja bastante selectivo enquanto o segundo tipo de método terá de ser bastante versátil porque tem de ser capaz de detectar compostos com características químicas diferentes.

A SPME tem vindo a ser utilizada para análise de pesticidas em água, existindo muito pouca informação publicada relativamente a outro tipo de matrizes, tais como solos, sedimentos, diversos tipos de cultura e seus produtos, como é o caso das uvas e do vinho. Por esse motivo foi difícil recolher informações sobre outros métodos anteriormente propostos para a determinação de pesticidas em vinhos e mostos usando SPME e GC-MS, principalmente em relação a alguns dos pesticidas estudados.

Como a SPME é uma técnica relativamente recente, que não envolve a utilização de solventes perigosos e capaz de ser utilizada em diferentes matrizes e relativamente a diversos analitos, esta seria uma técnica interessante no desenvolvimento do trabalho proposto.

Capítulo 4 – Aspectos Gerais da Parte Experimental

Índice

CAPÍTULO 4 – ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL 137

4.1 - INTRODUÇÃO 139
4.2 – REAGENTES E SOLUÇÕES 139
4.3 – MATERIAL E EQUIPAMENTO 141
4.4 – PROCEDIMENTOS GERAIS PARA O ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL 143
4.5 – OUTROS ASPECTOS EXPERIMENTAIS 144

4.1 - Introdução

Neste capítulo apresentam-se os aspectos gerais da parte experimental. Referem-se primeiro os reagentes e soluções utilizados, bem como o modo de preparação destas. Depois, inclui-se uma parte sobre o material e equipamento utilizado. Finalmente, faz-se uma descrição de alguns procedimentos efectuados para o acondicionamento do material e outros aspectos importantes da parte experimental.

4.2 – Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de qualidade p.a. ou semelhante, sem qualquer purificação adicional, excepto nos casos referidos.

As soluções de stock de pesticidas foram preparadas por dissolução dos referidos pesticidas em Metanol, de qualidade PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 334485. Foram depois preparadas soluções de trabalho com mistura de várias soluções de stock de pesticidas a partir da diluição rigorosa em Metanol PESTANAL ou em água Millipore. Estas soluções foram preparadas semanalmente.

A lista de pesticidas utilizados é a seguinte:

Dicofol PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 36677

Imidaclopride PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 37894

Procimidona PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 36640

Vinclozolina PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 45705

Fenarimol PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 45484

Diclofluanida PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 45433

Mancozebe PESTANAL, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 45553

Iprodiona PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 36194

Fosalona PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 36194

Folpete PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 45512

Flufenoxurão PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 460691

Clorpirifos PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 45395

Azoxistrobina PESTANAL, comercializado pela Sigma-Aldrich com a referência 46160

Para a preparação de amostras foram utilizados vários reagentes:

Sulfito de Sódio Anidro, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 31454

Cloreto de Sódio, comercializado pela Panreac com a referência 1311659.1211

Etanol Absoluto Chromasolv, comercializado pela Riedel-de Haën com a referência 34870.

As amostras foram preparadas com a adição de água Millipore.

Os pesticidas aplicados na vinha foram os seguintes:

Rubigan 12, comercializado pela Aventis, em solução com concentração 120 g/l de Fenarimol ou 12,2% (p/p). Embalagem de 40 mililitros.

Mancozan, comercializado pela Aventis, em formulação de pó molhável com concentração 80 % (p/p) de Mancozebe. Embalagem de 250 gramas.

Ronilan, comercializado pela BASF/SAPEC, em formulação de aglomerado dispersível em água com concentração de 50% (p/p) de Vinclozolina. Embalagem de 250 gramas.

Confidor, comercializado pela Bayer, em solução com concentração de 200g/l de Imidaclopride ou 17,7% (p/p). Embalagem de 1 litro.

Euparene, comercializado pela Bayer, em formulação de pó molhável com concentração 50% (p/p) de Diclofluanida. Embalagem de 200 gramas.

Systhane S, comercializado pela Rohm & Haas, em solução com concentração 125 g/l de Miclobutanil ou 13,5% (p/p). Embalagem de 24 mililitros.

Driza, comercializado pela EPAGRO, em formulação de pó molhável com concentração 50% (p/p) de Procimidona. Embalagem de 150 gramas.

Kelthane MF, comercializado pela Permutadora, em solução com concentração 480 g/l de Dicofol ou 41,3% (p/p). Embalagem de 100 mililitros.

4.3 – Material e equipamento

Na preparação de soluções foi utilizado material de vidro de classe A (nomeadamente balões volumétricos e pipetas), sendo utilizadas também micropipetas Gilson.

As soluções padrão de pesticidas foram armazenadas num frigorífico, e guardadas em frascos de vidro de 50 ml, comercializados pela Supelco, com a referência 33108-U, fechados com septos PTFE/Silicone, comercializados pela Supelco, com a referência 2-7541 e tampas de alumínio comercializadas pela Supelco, com a referência 27227-U.

Para controlar a temperatura de extracção utilizou-se um banho de água termostatizado por um sistema regulador de temperatura FALC FA 90 (± 0,1° C). Os frascos com as amostras foram mergulhados num gobelé de paredes duplas Duran 50, pelo qual passava a água proveniente do banho.

A temperatura foi controlada com um termómetro para SPME, com um intervalo de -10 a 110 (±0,5) ° C, comercializado pela Supelco, com a referência 57332.

As amostras foram submetidas a agitação, utilizando barrinhas magnéticas MAXWELL de 15 mm e agitador magnético Framo-Gerätetechnik.

As extracções foram realizadas com fibras SPME, comercializadas pela Supelco, com os seguintes tipos de revestimento: Polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm e Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) 75 µm. As fibras foram inseridas num suporte para fibras (SPME Manual Holder), comercializado pela Supelco, com a referência 57330-U, e foram seguras sobre os frascos de amostra, em posição de extracção, utilizando um suporte universal, garras e nozes. Usaram-se frascos de amostra com um volume de 22 ml, comercializados pela Supelco, com a referência 27173. Para fechar os frascos, foram utilizados septos PTFE/Silicone, comercializados pela Supelco, com a referência 27177, e tampas sólidas de PTFE, comercializadas também pela Supelco, com a referência 27174-U.

Após a extracção dos compostos existentes nas amostras, as determinações analíticas foram realizadas num Cromatógrafo Gasoso Varian, modelo 3900, acoplado a um detector de massa Varian, modelo 2100 T. O cromatógrafo dispõe de um liner de injecção para SPME Merlin Microseal e está equipado com uma coluna de separação Varian, referência CP-SIL 8 CB low bleed/MS de 60 metros de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O cromatógrafo liga-se por uma placa de rede a um computador pessoal Dell, onde se faz o controlo do aparelho e captura de dados com o programa Saturn WS versão 5.52. Os resultados foram determinados a partir da aplicação SatView, que faz parte desse programa, a partir das áreas dos picos para os iões seleccionados.

O gás de arraste utilizado na cromatografia foi Hélio, comercializado pela Praxair, referência 6.0, grau de pureza de 99,9999%.

As amostras de uvas, mais concretamente os cachos de uvas, recolhidos foram guardados em sacos plásticos com fecho hermético Auchan, e conservadas no frigorífico a uma temperatura de 4° C. As amostras recolhidas durante a microvinificação foram guardadas em frascos de centrífuga cónicos Corning, com volume de 50 ml, em polipropileno e esterilizados. As amostras foram depois conservadas em primeiro lugar num frigorífico a 4° C e depois numa arca congeladora a -6° C.

4.4 – Procedimentos gerais para o acondicionamento do material

O material utilizado requer certos cuidados para garantir que os resultados não venham afectados de erros graves devido a contaminantes. Os frascos, as tampas, os septos, as barrinhas magnéticas e as fibras foram acondicionados para assegurar esse objectivo.

Os frascos, após serem retirados da embalagem de fábrica, foram inseridos durante pelo menos 24 horas num banho de ácido nítrico a 20%, numa caixa de plástico grosso resistente, para oxidar qualquer tipo de contaminantes, nomeadamente os de origem orgânica, que pudessem trazer. Após esse período de tempo, os frascos foram retirados e lavados abundantemente com água desionizada. Logo de seguida foram guardados numa estufa, com a temperatura a rondar os 60° C, para ficarem secos. Após a utilização dos frascos, o seu conteúdo foi despejado para um frasco de vidro escuro e grande capacidade (2 litros), reservado para o efeito e bem identificado. Este frasco ficou guardado na hotte, para depois o seu conteúdo ser submetido a um processo adequado de tratamento de resíduos de metanol contendo pesticidas. Depois de estarem vazios, os frascos foram lavados com água desionizada e inseridos no banho de ácido nítrico. A partir daqui seguiu-se o mesmo procedimento acima descrito.

Quanto às tampas, estas foram bem lavadas com água desionizada e guardadas na estufa.

Já em relação aos septos, estes foram muito bem lavados antes de serem acondicionados a 250° C durante uma hora. Após serem utilizados e, se foi necessário utilizá-los novamente, foram lavados e submetidos novamente à etapa de acondicionamento. Claro que os septos neste caso já não vedavam bem porque já tinham orifícios e, como as extracções decorrem a temperaturas mais elevadas que a temperatura ambiente, as perdas de vapor são significativas. A forma encontrada para contornar este problema foi utilizar simultaneamente dois septos para que os orifícios não fossem coincidentes. Verificou-se que os septos utilizados desta forma conseguiam vedar bem o frasco.

Relativamente às barrinhas magnéticas, estas foram sempre bem lavadas com água desionizada após cada utilização. Inicialmente, eram depois guardadas num frasco com metanol. Dessa forma, pensava-se que os pesticidas que eventualmente pudessem estar adsorvidos à superfície das barrinhas seriam libertados e passavam para a solução, não havendo problemas de contaminação cruzada. No entanto verificou-se posteriormente que ocorriam contaminações de pesticidas nos ensaios. Eliminando um a um os possíveis responsáveis pela contaminação, constatou-se que as responsáveis pela contaminação seriam as barrinhas. O primeiro passo para controlar e eliminar a contaminação foi substituir o metanol do frasco para as guardar e acondicioná-las no banho de ácido nítrico. No entanto, verificou-se que essa solução era apenas provisória, pelo que se optou por deixar as barrinhas no ácido nítrico, sempre que não estejam em uso. Desta forma conseguiu-se eliminar as contaminações.

Quanto às fibras, o processo de acondicionamento seguido foi o aconselhado pela empresa que as comercializa. No folheto incluso na embalagem das fibras explica-se qual o tipo de procedimento a seguir para acondicionar as fibras, assim como outro tipo de informações. No entanto, o procedimento descrito tem a ver apenas com a limpeza a que as fibras devem ser submetidas antes da primeira utilização, sendo suficiente para as limpar dos compostos provenientes do processo de produção. Não é referido qualquer processo de limpeza corrente da fibra. Decidiu-se então seguir o mesmo processo para a limpeza regular e diária das fibras. Assim, antes de iniciar um dia de trabalho, a fibra era acondicionada, expondo-a a uma temperatura de 250° C por um período nunca inferior a 30 minutos.

4.5 – Outros aspectos experimentais

Antes do início de cada dia de trabalho, era realizada uma verificação do estado do aparelho (auto-tune) relativamente à razão ar/água que entra no sistema. Uma vez por semana, realizava-se o auto-tune completo, já que não era necessário que este fosse feito quotidianamente.

Todo o processo de extracção e injecção deve ser mecanizado para aumentar a reprodutibilidade entre injecções. Vários factores podem contribuir para diminuir a repetibilidade das injecções, entre eles, a temperatura, o tempo de extracção e a agitação da amostra. O controlo do tempo das injecções é um factor muito importante. Como normalmente não são usadas as condições de equilíbrio para a realização dos ensaios, o tempo afecta profundamente os resultados obtidos. Assim, o tempo de extracção foi sempre controlado com a ajuda de um cronómetro. Segundo as experiências realizadas, eram precisos pelo menos 8 minutos para que a amostra atingisse a temperatura do banho, se este se encontrar a 50° C (Tabela 4.1). Por esta razão, após cada injecção introduzia-se a amostra seguinte no banho, ficando neste durante cerca de 14 minutos, até que o novo procedimento de extracção fosse iniciado. Desta forma garantiu-se que a amostra atingia a temperatura do banho e ficava num estado de equilíbrio térmico. Um aspecto que importa desde já realçar é que surge sempre um diferencial entre a temperatura introduzida na cabeça de aquecimento do banho e a temperatura da amostra. No caso da temperatura introduzida ser 50° C, a temperatura de equilíbrio atingida pela amostra é 47,0° C. Como não é prático estar a determinar qual é a temperatura de cada amostra analisada, os valores que são indicados no texto referem-se sempre à temperatura introduzida na cabeça de aquecimento.

A agitação da amostra é outro factor importante num método de microextracção em fase sólida. Sendo promovida pela rotação da barrinha magnética, esta tem duas funções principais: a primeira é promover o equilíbrio da concentração dos analitos na amostra, facilitando assim a difusão destes. Desta forma, a passagem dos pesticidas para a fase de vapor é mais rápida e eficaz; a segunda função é criar um vórtex na solução, o que facilita a transferência dos pesticidas para a fase de vapor porque aumenta a interface vapor/amostra. A agitação da amostra é também muito importante para a reprodutibilidade das condições de execução, pelo que, a velocidade de rotação da barrinha foi mantida em todos os ensaios.

Tabela 4.1 – Tempos de estabilização da temperatura para a imersão de amostras no banho de aquecimento

Temperatura do banho	48º C
Temperatura introduzida	50º C
Temperatura da amostra /º C	Tempo / min
24,5	0,0
39,0	1,0
-	2,0
44,0	3,0
45,5	4,0
46,0	5,0
46,5	6,0
46,5	7,0
47,0	8,0
47,0	9,0
47,0	10,0

Barrinhas de 10 mm

Temperatura do banho	56º C
Temperatura introduzida	60º C
Temperatura da amostra /º C	Tempo / min
22,5	0,0
48,0	1,0
53,5	2,0
54,5	3,0
55,0	4,0
55,5	5,0
56,0	6,0
56,0	7,0
56,0	8,0
56,0	9,0
56,0	10,0

Barrinhas de 15 mm

Ao longo das experiências testou-se também a influência do tamanho da barrinha magnética. Inicialmente utilizaram-se barrinhas comercializadas pela Supelco, com a referência Z 118877-3EA, com cobertura de PTFE e as dimensões de 10×3 mm. Verificou-se que, para volumes de 10 ml, a agitação não era suficiente e não formava qualquer vórtex. Testaram-se também barrinhas de 12 e 15 mm de comprimento, verificando-se que o aumento do comprimento proporcionava uma maior eficiência de agitação e também um maior vórtex, pelo que se resolveu utilizar as de 15 mm. Como era necessário que a agitação fosse a maior possível, sem que criasse problemas de reprodutibilidade de agitação, constatou-se que seria possível utilizar o valor máximo de rotação do agitador magnético, que eram as 1400 rpm.

Capítulo 5 – Programas de Cromatografia Gasosa e Espectroscopia de Massa

Índice

CAPÍTULO 5 – PROGRAMAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROSCOPIA DE MASSA 147

5.1 INTRODUÇÃO 149

5.2 O PRIMEIRO PROGRAMA GC/MS 149

5.2.1 Parte relativa à Cromatografia Gasosa 149

5.2.2 Parte relativa à detecção por Espectroscopia de Massa 150

5.2.4 Parte relativa à interface GC-MS 150

5.3 DESCRIÇÃO GERAL DOS PROGRAMAS UTILIZADOS 151

5.1 Introdução

Este capítulo é dedicado à descrição e avaliação dos programas de cromatografia que foram utilizados durante a fase inicial do trabalho. Mostra-se ainda a evolução ao longo da implementação do método e em que medida cada programa garantia o que era pretendido e onde falhava.

5.2 O primeiro programa GC/MS

A parte inicial do trabalho baseou-se no artigo de Soleas et all. [28]. Este trabalho descreve a determinação de pesticidas por GC/MS mas o método de extracção usado não era a SPME, nem a coluna cromatográfica era a mesma. Houve, portanto, necessidade de alterar alguns dados para adequar o programa ao facto de utilizar fibras de SPME. Assim, a temperatura do injector passou de 270° C para 250° C, a temperatura aconselhada para as fibras. O split fica fechado nos primeiros 5 minutos, o que deve ser suficiente para que todos os compostos a determinar se libertem da fibra e entrem na coluna.
Este programa vai ser descrito com mais detalhe, pois serviu de base para a criação de todos os outros.

5.2.1 Parte relativa à Cromatografia Gasosa

A Temperatura usada do Injector foi de 250° C e manteve-se durante todo o ensaio e tempo de stand-by.

O Estado da partição do injector durante o programa foi o seguinte: Inicialmente a partição estava ligada, com uma razão de 20. No instante seguinte, após 0,01 minutos de iniciar o programa, a partição fechava, permanecendo neste estado até aos 5,00 minutos após o inicio do programa, altura em que voltava a ligar, com a mesma razão de partição. E ficava neste estado até ao fim do programa.

A partição divide o fluxo de gás que passa pelo injector e permite que apenas parte desse fluxo entre para a coluna. Antes do programa se iniciar, a partição estava ligada e apenas deixa entrar 20% do gás. Na fracção mínima de tempo possível depois da corrida se iniciar, a partição fechava-se e todo o gás entrava para a coluna. Esta situação mantém-se durante 5 minutos, tempo findo o qual, a partição voltava a abrir e regressa à situação em que apenas 20% do gás entrava na coluna.

O caudal da coluna é 1,0 ml min^{-1} e permaneceu constante durante todo o ensaio.

O programa de temperaturas era o seguinte: a temperatura inicial foi 70° C e manteve-se por 0,50 minutos. A temperatura subia até 270° C a um ritmo de 10,0° C por minuto, mantendo essa temperatura durante 0,10 minutos. Finalmente, a temperatura subia até os 290° C a um ritmo de 25,0° C por minuto, mantendo-se depois durante 2,00 minutos.

O tempo de estabilização do aparelho foi definido a 0,30 minutos.

5.2.2 Parte relativa à detecção por Espectroscopia de Massa

Em relação à espectroscopia de massa, o programa foi dividido em dois segmentos. O primeiro, relativo aos 12,50 minutos iniciais, em que o detector se encontra desligado. Já o segundo segmento decorre desde os 12,50 minutos até ao fim da corrida (23,40 minutos). Durante este segmento, o menor fragmento considerado é de 29 m/z, enquanto o maior é de 300 m/z. O modo de ionização utilizado foi Impacto de Electrões, em modo automático. Os scans realizados no intervalo de massa considerado são equivalentes.

5.2.4 Parte relativa à interface GC-MS

Como já foi referido no capítulo relativo às técnicas utilizadas, a interface entre o GC e o MS é muito importante e portanto ficam registados os parâmetros fundamentais. A temperatura da armadilha ("Trap") é 150° C, a do "manifold" é 50° C e a temperatura da linha de transferência ("Transfer line") é 170° C. Estes valores mantêm-se em todos as análises realizadas, fazendo

parte dos parâmetros do aparelho e não são alterados a partir dos programas criados.

5.3 Descrição geral dos programas utilizados

Os dados do programa inicial encontram-se resumidos na Tabela 5.1, que será depois usada como base para descrever os restantes programas, de forma a facilitar a apresentação da informação e comparação entre eles. De qualquer forma serão sempre descritas as alterações feitas em relação aos programas anteriores e a razão dessas alterações.

Este programa foi então usado para os ensaios iniciais mas não apareciam todos os pesticidas que eram introduzidos nas amostras e os tempos de retenção não coincidiam com os tempos descritos por Soleas et all. [28]. Para testar a hipótese de alguns pesticidas terem tempos de retenção inferiores a 12,50 minutos (tempo de análise cromatográfica em que o detector é activado), seria necessário reduzir o tempo durante o qual o detector está desligado. Escreveu-se então o programa Pesticida_1. Este programa é idêntico ao programa Pesticida, mas o detector é ligado é aos 2,00 minutos e não aos 12,50 minutos. Manteve-se um intervalo de 2 minutos após a activação do método de forma que o detector não ficasse saturado com os compostos de tempo de retenção muito baixo. Os parâmetros deste método encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.1 – Descrição do programa Pesticida

Programa: PESTICIDA					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	12,50	40	650	Nenhum
Pesticida	12,50	23,40	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	270	290	Fluxo de gás: 1,00 ml/min	
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	25,00		
Manter temperatura (min.)	0,50	0,10	2,00		
Total (min.)	0,50	20,60	23,40		
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Utilizando o programa Pesticida_1 foi possível detectar e identificar três pesticidas. No entanto, um deles ainda não tinha sido detectado até aparecer com um tempo de retenção semelhante ao de outro. Colocando a hipótese de terem tempos de retenção semelhantes, foi criado um novo programa, Pesticidas_2, com o intuito de separar melhor os compostos, fazendo para isso uma diminuição do fluxo do gás (Tabela 5.3). As principais alterações introduzidas foram a diminuição do fluxo do gás para 0,9 ml min^{-1}, e o aumento do tempo em que se mantém a temperatura de 290° C, resultando num método com uma duração mais longa (30,00 minutos). Conseguiu-se identificar o Dicofol mas o seu tempo de retenção é muito diferente dos restantes encontrados. Assim sendo, é muito estranho que tenha aparecido com o mesmo tempo de retenção anteriormente. Mesmo que ele não tenha sido "libertado" da coluna na mesma corrida em que foi injectado, é uma

coincidência extraordinária que saísse na corrida seguinte com o mesmo tempo de retenção de outro pesticida. Mas tal facto aconteceu por três vezes.

Tabela 5.2 – Descrição do programa Pesticida_1

Programa: PESTICIDA_1					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	23,40	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	270	290	Fluxo de gás: 1,00 ml/min	
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	25,00		
Manter temperatura (min.)	0,50	0,10	2,00		
Total (min.)	0,50	20,60	23,40		
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Tentou-se outro tipo de abordagem ao problema: em vez de diminuir o fluxo do gás, alterou-se a rampa de aquecimento do forno. Para tal foi criado outro programa, Pesticida_3, em que as principais alterações residem na diminuição da velocidade de aquecimento da coluna e no aumento dos tempos de temperatura estabilizada (Tabela 5.4). Consegue-se assim que o aquecimento seja mais lento, fazendo com que os compostos se libertem mais lentamente, originando tempos de retenção maiores e também melhor separação entre compostos.

Tabela 5.3 – Descrição do programa Pesticida_2

Programa: PESTICIDA_2					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	30,00	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	270	290	Fluxo de gás: 0,90 ml/min	
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	25,00		
Manter temperatura (min.)	1,00	1,00	7,20		
Total (min.)	1,00	22,00	30,00		
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Com este programa era também possível identificar o Dicofol, demonstrando ser uma alternativa viável. Comparando os dois programas, considerou-se que seria preferível usar um programa em que não implicasse grandes alterações no funcionamento corrente do cromatógrafo. Assim, e porque o fluxo de gás de arrasto é mantido a 1,0 ml min^{-1}, foi decidido continuar a utilizar e desenvolver o programa Pesticida_3.

Tabela 5.4 – Descrição do programa Pesticida_3

Programa: PESTICIDA_3					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	35,00	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	270	290	Fluxo de gás: 1,00 ml/min	
Razão aumento(° C/min.)	0,00	8,00	20,00		
Manter temperatura (min.)	1,00	2,00	6,00		
Total (min.)	1,00	28,00	35,00		
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Um novo factor passou também a entrar em linha de conta para a optimização do método: a separação dos compostos com massa molecular mais baixa. O interesse na detecção deste tipo de compostos tem a ver com a tentativa de detecção de produtos de transformação dos pesticidas. Criou-se um novo programa, denominado Pesticida_4, com o intuito de fazer uma melhor separação desses compostos, cuja principal alteração relativamente ao anterior constituiu na redução da temperatura inicial de 70° C para 50° C (Tabela 5.5). Desta forma, os compostos de menor massa molecular deslocam-se mais lentamente ao longo da coluna cromatográfica, sendo possível identificar mais facilmente alguns dos produtos de degradação dos pesticidas.

Tabela 5.5 – Descrição do programa Pesticida_4

Programa: PESTICIDA_4					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	50,00	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	40	70	270	290	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	8,00	20,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	0,50	1,00	2,00	17,50	
Total (min.)	0,50	4,50	31,50	50,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

O programa foi utilizado com relativo sucesso já que tornava possível a detecção de todos os pesticidas até então analisados. No entanto tinha uma duração demasiado longa pelo que foi criado um programa com uma duração menor, mas com as mesmas características gerais, excepto no tempo em que a temperatura é mantida até ao final do ensaio, que foi reduzido em 10 minutos. Foi então criado o programa Pesticida_4_Short (Tabela 5.6), que utiliza a mesma designação do seu antecessor pelas razões apontadas acima.

Tabela 5.6 – Descrição do programa Pesticida_4_Short

Programa: PESTICIDA_4_Short					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	40,00	29	350	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	40	70	270	290	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	8,00	20,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	0,50	1,00	2,00	7,50	
Total (min.)	0,50	4,50	31,50	40,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Este programa foi utilizado durante algum tempo, com o mesmo sucesso relativo do seu antecessor.

Com a introdução de novos pesticidas no grupo dos que estavam a ser identificados, foi necessário alterar novamente o programa para tentar ter um tempo de análise razoavelmente extenso e ser possível a separação de todos os pesticidas. Assim foram criados dois novos programas, um com maior duração através do aumento da duração da temperatura a 290° C, Pesticida_Screening (Tabela 5.7), e o outro através de uma curva de temperaturas menos acentuada para melhor separação de composto com baixo peso molecular, Pesticida_Screen_Hydro (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 – Descrição do programa Pesticida_Screening

Programa: PESTICIDA_Screening					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	60,00	29	400	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	40	70	270	290	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	8,00	20,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	0,50	1,00	2,00	27,50	
Total (min.)	0,50	4,50	31,50	60,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Os resultados obtidos com a utilização destes dois programas não foram satisfatórios: além dos 4 pesticidas que foram estudados ao longo dos ensaios realizados anteriormente, apenas mais dois pesticidas foram identificados (Clorpirifos e Folpete). Não foi possível apurar a razão porque os restantes pesticidas não eram identificados. Criou-se então um novo programa, Pesticida_5, seguindo o artigo de Arrebola et all. [29]. O trabalho descrito nesse artigo permite a determinação de 81 pesticidas diferentes num só ensaio. Grande parte dos pesticidas que se pretende estudar encontra-se nessa lista e daí o seu interesse. Este programa não é semelhante aos anteriormente criados pelo que são enunciadas as diferenças entre eles (Tabela 5.9).

Tabela 5.8 – Descrição do programa Pesticida_Screen_Hydro

Programa: PESTICIDA_Screen_Hydro					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	80,00	29	400	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	40	70	270	290	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	10,00	6,00	20,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	0,50	1,00	2,00	39,17	
Total (min.)	0,50	4,50	39,83	80,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Dos ensaios realizados logo se concluiu que este programa não apresentava vantagens em relação aos programas da família do Pesticida_4, principalmente por ser demasiado extenso e não conseguir identificar mais pesticidas. Ainda assim foi testado um programa Pesticida_5_Short, com duração mais reduzida do que o antecessor e começando a 150° C (Tabela 5.10), mas que se revelou igualmente ineficaz.

Tabela 5.9 – Descrição do programa Pesticida_5

Programa: PESTICIDA_5					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	80,00	29	400	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	150	180	183	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	50,00	5,00	1,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	3,50	0,00	0,00	4,00	
Total (min.)	3,50	5,10	11,10	18,10	
Temperatura final(° C)	191	205	300		
Razão aumento(° C/min.)	1,00	1,00	4,00		
Manter temperatura (min.)	4,00	0,00	12,15		
Total (min.)	30,10	44,10	80,00		
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Criou-se um programa, denominado Pesticida_6, baseado no Pesticida_4 mas com temperatura inicial de 70° C, para reduzir o tempo de ensaio e também porque se verificou que os compostos de massa molecular menor encontrados não tinham grande interesse analítico para este trabalho. Este programa revelou-se melhor que os antecessores Pesticida_4 e 5 porque apresentava menos sinais indesejáveis mas não apresentava quaisquer melhorias em termos de detecção de todos os pesticidas.

O programa foi utilizado para a optimização do método, sendo pontualmente alterado. Foi também o ponto de partida para outros programas, que foram criados para tentar identificar os pesticidas que não foram encontrados, utilizando para isso durações de ensaio maiores ou aumentando a temperatura

final da coluna para tentar que os pesticidas eventualmente retidos se deslocassem em direcção ao detector. Contudo não foi possível detectar os restantes pesticidas.

Tabela 5.10 – Descrição do programa Pesticida_5_Short

Programa: PESTICIDA_5_Short					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	50,00	29	400	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			5,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	150	180	205	300	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	5,00	5,00	4,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	0,00	2,00	1,10	12,15	
Total (min.)	0,00	8,00	14,10	50,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

As alterações introduzidas no programa foram as seguintes: inicialmente o programa tinha a temperatura máxima de 290° C e uma duração de 45 minutos, sendo depois alterado para uma temperatura máxima de 300° C e uma duração de 40 minutos. Também o split do injector inicialmente estava fechado durante os primeiros 5 minutos e passou a ficar durante 7 minutos para permitir que uma maior quantidade dos compostos entrem para a coluna. A Tabela 5.11 mostra o programa final.

Tabela 5.11 – Descrição do programa Pesticida_6

Programa: PESTICIDA_6					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Delay	0,00	2,00	40	650	Nenhum
Pesticida	2,00	40,00	29	300	EI Auto
Descrição do segmento 2 - Pesticida					
Injector					
Tipo de injector:	1177		Tempo (min.)	Split	Razão Split
Temperatura:	250° C		Inicial	Ligado	20
			0,01	Desligado	Desligado
			7,00	Ligado	20
Coluna e Forno					
Temperatura final(° C)	70	270	290	300	Fluxo de gás
Razão aumento(° C/min.)	0,00	8,00	6,00	6,00	1,00 ml/min
Manter temperatura (min.)	1,00	1,00	3,00	5,00	
Total (min.)	1,00	27,00	33,33	40,00	
Modo de ionização					
Intervalo de massa	Nível de armazenamento de ionização			Factor do tempo de ionização	
10 a 99	35,0 m/z			100%	
100 a 249	35,0 m/z			100%	
250 a 399	35,0 m/z			100%	
400 a 650	35,0 m/z			100%	
Tempo de ionização pré-scan:	1500 microsegundos				
Valor mínimo de m/z utilizado:	28 m/z				
Valor máximo de m/z utilizado:	350,0 m/z				

Capítulo 6 – Implementação do método analítico

Índice

CAPÍTULO 6 – IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 163

6.1 INTRODUÇÃO 165
6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS 165
6.3 CARACTERÍSTICAS PRETENDIDAS PARA O MÉTODO ANALÍTICO 167
6.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO 168
6.4.1 O método inicial *169*
6.4.2 Ensaios exploratórios e identificação de sinais *169*
6.4.3 Avaliação da forma de aquisição de resultados *175*
6.4.4 Melhoramento do método analítico *179*
6. 5 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 187
6.5.1 Descrição geral do método *187*
6.5.2 Caracterização do método *188*
6.5.2.1 Avaliação da sensibilidade e calibração 188
6.5.2.2 Precisão do método 192
6.5.2.3 Limites de quantificação 194
6.5.3 Espécies identificadas *195*

6.1 Introdução

Neste capítulo referem-se os vários passos dados na implementação do método analítico. Inicialmente é feita uma revisão bibliográfica sobre métodos de determinação dos vários pesticidas e diferentes métodos de tratamento de amostra, que utilizam a cromatografia como técnica de separação. Posteriormente, são descritos os passos que foram dados de forma a melhorar o método analítico. Finalmente, é realizada a caracterização geral dos parâmetros analíticos mais importantes do método.

Durante o desenvolvimento do método surgiram dificuldades de índole temporal já que o desenvolvimento do método e a sua caracterização foram feitas enquanto se realizavam os trabalhos de campo. No Capítulo 7 explica-se a importância deste facto.

6.2 Revisão bibliográfica sobre determinação de pesticidas

Nesta secção referem-se os vários trabalhos em que se propunham métodos para a determinação dos pesticidas estudados, utilizando GC-MS ou SPME.

Como foi referido no capítulo 4, os trabalhos de Soleas et all. [28] e o de Arrebola et all. [29] foram seguidos para a criação dos programas cromatográficos. O trabalho de Soleas et all. descreve um método capaz de identificar 17 pesticidas em vinho, utilizando como técnica de recolha de amostra a Extracção em Fase Sólida (SPE). Entre os pesticidas estudados encontram-se Vinclozolina, Diclofluanida, Procimidona, Miclobutanil e Dicofol. As amostras foram analisadas por GC-MS, usando um ião m/z para a quantificação de cada pesticida. Os limites de detecção para os vários pesticidas variam entre 2 e 10 ppb. O desvio padrão relativo encontrado foi menor que 10%, sendo que afirmam que foi possível obter uma boa resolução de todos os compostos, numa análise que dura cerca de 23 minutos. Já o trabalho de Arrebola et all. refere-se ao desenvolvimento de um método capaz de detectar 81 pesticidas em vegetais, fazendo uma extracção rápida dos

produtos com diclorometano e analisando por GC-MS-MS. Entre os pesticidas detectados, encontram-se Vinclozolina, Dicofol, Procimidona, Miclobutanil e Fenarimol. Os resultados obtidos apresentam desvios-padrão relativos inferiores a 22% e referem que os limites de detecção e quantificação são inferiores aos níveis de resíduos estabelecidos pela legislação europeia.

Outro trabalho utilizado para esse efeito foi o de Jiménez et all. [30], visto que referia a determinação, entre outros, de Vinclozolina, Diclofluanida, Procimidona e Fenarimol em vinhos. A extracção dos produtos foi realizada por SPE, sendo a determinação feita por GC-ECD e GC-NPD (cromatografia gasosa acoplada a um detector de azoto e fósforo). Os limites de detecção encontrados são inferiores a 12 ppb.

O artigo de Navarro et all. [31] refere um método que realiza determinações de 17 fungicidas em amostras de uvas, mostos e vinho, sendo capaz de detectar Fenarimol, Miclobutanil, Procimidone e Vinclozolina, utilizando a extracção líquido-líquido e GC-EC. Os desvios-padrão relativos encontrados foram inferiores a 14%, estando os limites de quantificação no intervalo de 0,01 a 0,05 ppm. Lambropoulou et all. [32] desenvolveram um método para a determinação de 7 pesticidas em amostras de água natural, entre eles Vinclozolina e Diclofluanida, utilizando SPME e GC-ECD. O artigo refere o estudo da escolha da fibra de SPME mais adequada para o efeito assim como o estudo de vários parâmetros para o melhoramento do método. O método apresentava limites de detecção inferiores a 60 ppt.

Por outro lado, Correia et all. [33] desenvolveram um método capaz de determinar, entre outros, Vinclozolina, Procimidona e Fenarimol, em amostras de mosto e vinho, utilizando SPME e GC-ECD. Os limites de detecção foram próximos de 11 ppb e os desvios-padrão relativos inferiores a 20%. Finalmente, Correia et all. [34] referem-se a um método para a determinação de pesticidas em vinhos, capaz de detectar Diclofluanida, utilizando SPME e GC-ECD. Os limites de detecção encontrados eram inferiores a 5 ppb. Neste artigo refere-se também um estudo dos vários parâmetros de SPME.

Foram também recolhidas informações sobre outros métodos para a determinação de pesticidas em estudo mas que usavam diferentes técnicas de amostragem ou até diferentes técnicas analíticas: extracção líquido-líquido com GC-ECD [35,36], extracção líquido-líquido com membrana microporosa (MMLLE)

com GC acoplado a um detector de ionização de chama, GC-FID [37], extracção por sorpção com barra magnética (SBSE) e GC-MS [38] e HPLC [39].

Foram recolhidas outro tipo de informações relativas à técnica de SPME, aos procedimentos que se devem implementar durante o desenvolvimento de um método analítico, assim como à importância dos vários factores que contribuem para o bom funcionamento do método [40,41,42,43]. Entre os trabalhos destaque-se o de Boyd-Boland et all. [44], que utiliza GC-MS e SPME para a determinação de 60 pesticidas em amostras de água. Os diversos estudos relativamente à SPME foram indicações bastante importantes para o desenvolvimento do trabalho.

Como o trabalho envolvia também a detecção de produtos de degradação dos pesticidas em estudo, alguma bibliografia foi consultada. Foram procuradas informações sobre degradação de pesticidas [45,46,47] e também mais concretamente sobre os pesticidas em estudo [48,49,50,51,52].

6.3 Características pretendidas para o método analítico

O método pretendido deve ter capacidade para detectar o maior número de pesticidas simultaneamente, e ser suficientemente robusto para que tenha essas capacidades em diferentes matrizes, já que a produção de um vinho envolverá necessariamente alteração da matriz.

O método deve ser capaz de quantificar os pesticidas a 30 ppb, nível de concentrações que é inferior aos limites legais impostos em diversos países. É importante que o método tenha capacidade de detectar diferentes pesticidas pois, como o trabalho é feito em vinhas que produziram vinho para uma empresa, outros pesticidas podem estar presentes nas uvas, nomeadamente aqueles que foram aplicados durante toda a campanha até à vindima.

O valor de 30 ppb referente ao método utilizado rotineiramente pela empresa reflecte o conjunto de limites legais que existem em diversos países. Não existindo uniformidade da legislação, sendo em muitos casos até inexistente, este foi o valor adoptado como referência para o trabalho. Assim, o método deve ser estudado e melhorado tendo em conta este valor, já que, se o método

for montado no laboratório de uma empresa, o intervalo de concentrações em que o método é usado inclui concentrações da ordem dos 30 ppb.

Relativamente à robustez do método, este vai ser utilizado para efectuar determinações em diferentes tipos de amostras, nomeadamente em uvas, mosto, borras e vinho. Sendo assim, o método deve ser capaz de determinar os pesticidas em qualquer destas matrizes.

6.4 Desenvolvimento do método analítico

Nesta secção são descritos os passos e os procedimentos adoptados para o desenvolvimento e melhoramento do método analítico. Não se refere optimização porque não se procedeu à tentativa de encontrar o valor óptimo do método mas sim, melhorar as capacidades deste de acordo com o que era desejado. Foi feito um estudo de parâmetros de uma forma individual, fazendo uso pontualmente de alguns métodos de optimização multivariada.

Os programas de cromatografia encontram-se referidos apenas pelo seu nome, já que foram descritos no capítulo 5.

O desenvolvimento foi efectuado, tendo como etapa inicial a identificação dos picos relativos aos pesticidas. Claro que sempre que ocorre uma mudança de programa cromatográfico, a identificação dos picos tem de ser novamente realizada, mas o processo já se encontrará sistematizado. Após terem sido identificados os picos, procedeu-se a uma série de experiências para determinar quais os fragmentos m/z mais indicados para as determinações. Finalmente, o método foi melhorado, segundo as características pretendidas e, posteriormente, foram estudados os seus parâmetros mais importantes. A caracterização do método foi realizada em matriz de vinho branco, produzido pela Quinta de Azevedo, em colheita anterior como é óbvio, pelo que deverá ter características semelhantes ao vinho que se produzirá durante o trabalho.

6.4.1 O método inicial

O método envolve uma parte cromatográfica e outra parte de extracção por SPME. Como a técnica SPME é relativamente recente, não existem trabalhos descritos na literatura que envolvam a SPME com GC-MS, para os pesticidas que se pretendeu estudar. Por isso é fundamental que o método seja objecto de um estudo e seja implementado segundo as características que se pretende que ele tenha.

O método cromatográfico inicial foi baseado no artigo de Soleas et all. [28], tendo sido criado o programa Pesticida (descrito no Capítulo 5) a partir dos dados recolhidos nesse artigo. A partir deste método, foi desenvolvido todo o processo de implementação e desenvolvimento até se obter o método proposto. No que diz respeito ao método de extracção, iniciou-se por condições relativamente simples, que depois foram sendo alteradas, de forma a melhorar os resultados.

6.4.2 Ensaios exploratórios e identificação de sinais

Nestes primeiros ensaios pretendeu-se explorar as capacidades das técnicas de cromatografia, espectrometria de massa e SPME e identificar os sinais relativos aos pesticidas.

Os primeiros testes foram realizados usando cada uma das fibras disponíveis (PDMS, PDMS-DVB e PDMS-CAR), em condições de extracção simples. Assim, o método de extracção ocorreu em headspace, à temperatura ambiente, durante 20 minutos, sem agitação da solução. A desadsorção ocorreu durante 10 minutos, à temperatura do injector (250º C). No entanto, nestas experiências iniciais, as condições experimentais não foram muito importantes, uma vez que apenas se pretendia identificar os sinais dos pesticidas, pelo que foram mantidas nos restantes ensaios realizados.

Os pesticidas submetidos a estes ensaios iniciais foram: Diclofluanida, Dicofol, Procimidona e Vinclozolina. As amostras foram preparadas com água, em todos os ensaios exploratórios. As concentrações utilizadas foram relativamente elevadas (cerca de 2 ppm), de forma a ser mais provável a obtenção do sinal dos pesticidas.

Optou-se inicialmente por realizar as extracções em headspace já que desta forma se consegue atenuar os efeitos de matriz (que em amostras de vinho devem ser visíveis) e também porque se pretendia uma maior longevidade das fibras. Quanto à temperatura ambiente, a possível variação deste parâmetro não é muito importante, para os ensaios iniciais, já que o laboratório em que se realizaram as extracções tem um aparelho de ar condicionado, pelo que as variações de temperatura devem ser pequenas. Inicialmente a agitação da amostra não seria um factor primordial já que se pretendia apenas identificar os tempos de retenção dos pesticidas, pelo que se optou por não promover a agitação das soluções mas utilizaram-se concentrações elevadas de cada composto. Quanto à temperatura de desadsorção, foi decidido que fosse 250º C já que era a temperatura máxima a que duas das fibras podiam estar expostas (PDMS e PDMS-DVB). A temperatura máxima para a fibra PDMS-CAR era de 300º C. Para que a desadsorção fosse tão extensa e rápida quanto o possível, a temperatura a que esta ocorreria deveria ser a mais elevada possível. Relativamente ao tempo de desadsorção, este foi de 10 minutos, um intervalo de tempo considerado suficiente.

Nas primeiras experiências, foram identificados os pesticidas Vinclozolina, Diclofluanida e Procimidona. Não foi identificado, em nenhum dos casos, o Dicofol (ver Tabela 6.1). Os cromatogramas obtidos eram compostos de diversos sinais, de intensidade bastante diversa. Estes sinais foram depois sujeitos a um processo de identificação, utilizando o programa informático e a base de dados do espectrómetro de massa. Cada pico obtido fornecia a sua área e também o espectro de massa, o que permitia que o programa fizesse uma comparação desse espectro com os que possui na base de dados, para identificação das espécies envolvidas. Os resultados obtidos relativos à identificação das espécies responsáveis pelo sinal no cromatograma são dados com um grau de probabilidade (Figura 6.1), já que podem existir, com o mesmo tempo de retenção, outras espécies, sendo o sinal então composto e não devido a uma única espécie. Assim foi possível identificar alguns pesticidas e também algumas espécies que se supôs serem produtos de degradação dos pesticidas utilizados.

Relativamente aos sinais obtidos para cada fibra, verificou-se que os picos de área mais elevada são os obtidos com a fibra PDMS, sendo que a fibra PDMS-

DVB produz sinais de área intermédia enquanto a fibra PDMS-CAR tem sinais muito pequenos, não sendo possível sequer identificar o Procimidona. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.1.

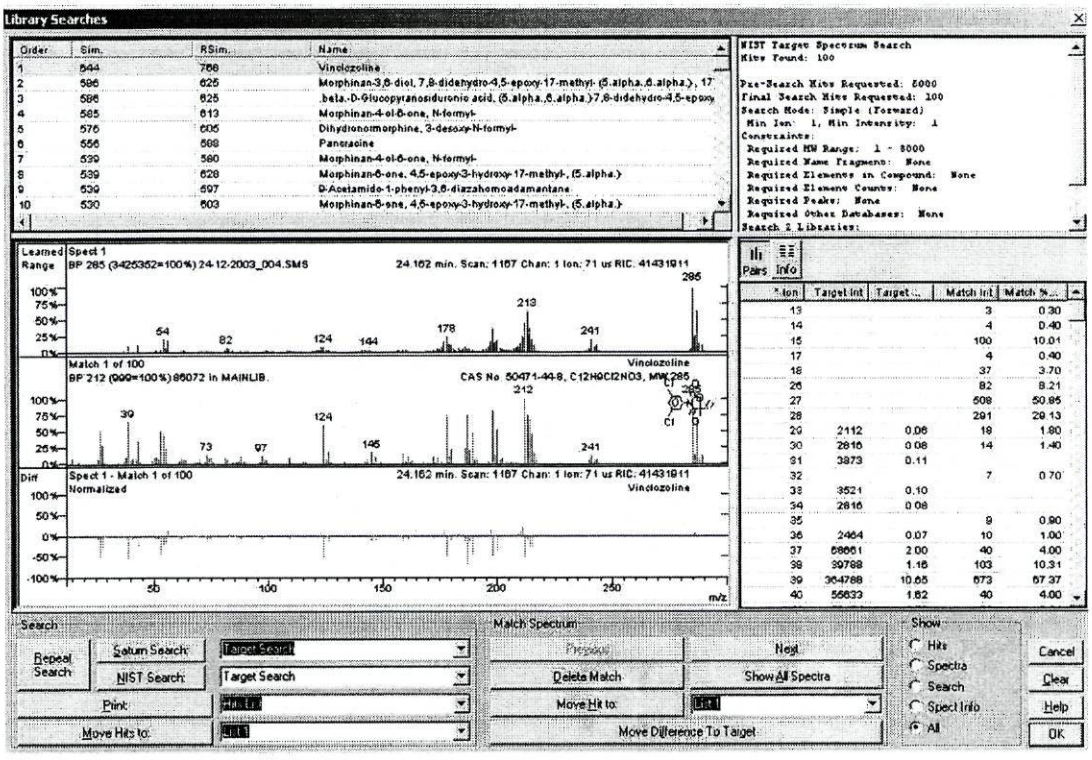


Figura 6.1 – Programa de identificação do espectro de massa

Tabela 6.1 – Resultados obtidos para o programa Pesticida

		Áreas dos picos		
Pesticidas	Tr (min.)	PDMS	PDMS-DVB	PDMS-CAR
Vinclozolina	20,14	5.452.333	3.668.915	155.268
Diclofluanida	20,98	3.868.451	1.881.764	186.671
Procimidona	22,11	1.514.244	1.245.112	-
Dicofol	-	-	-	-

Após estes ensaios, e na tentativa de identificar o Dicofol, foi utilizado o programa Pesticida_1, em que a detecção é feita 2 minutos após o início da

análise, de forma a permitir a identificação do maior número de compostos. O método de extracção foi ligeiramente alterado, visto que se introduziu a agitação da amostra, de forma a facilitar a extracção das espécies. Este facto justifica-se dado que o não aparecimento do pico do Dicofol poderia dever-se a dificuldade na sua extracção da solução analisada. Com a agitação da amostra, a difusão dos pesticidas do seio da solução para a interface solução-headspace seria facilitada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.2. Foram novamente avaliadas as três fibras, tendo-se chegado a conclusões semelhantes às obtidas para o programa Pesticida.

Tabela 6.2 – Resultados obtidos para o programa Pesticida_1

		Áreas dos picos		
Pesticidas	Tr (min.)	PDMS	PDMS-DVB	PDMS-CAR
Vinclozolina	20,14	12.166.222	10.701.131	339.512
Diclofluanida	20,96	7.344.698	6.446.851	371.721
Procimidona	22,09	1.120.435	1.201.608	-
Dicofol	-	-	-	-

Como se pode verificar a partir da Tabela 6.2, as áreas obtidas para as fibras PDMS e PDMS-DVB são semelhantes e um pouco menores para a PDMS-DVB. Comparando com os resultados da Tabela 6.1, e sabendo que a única alteração efectuada entre os dois ensaios foi a agitação da amostra, comprova-se que esta facilita a extracção dos pesticidas da solução. A fibra PDMS-CAR continua a produzir sinais muito pequenos, não existindo uma variação significativa pela introdução da agitação da amostra, sendo que novamente não se obtém qualquer sinal para o Procimidona.

Em experiências realizadas posteriormente, foi possível identificar o sinal do Dicofol, mas apenas no ensaio posterior à introdução da amostra no sistema cromatográfico, em que se pretendia verificar a limpeza da fibra e da coluna. Este facto levou a concluir que o Dicofol teria ficado retido na coluna porque a duração do ensaio cromatográfico seria demasiado curto.

Foram então usados os programas, Pesticida_2 e Pesticida_3 (descritos no Capítulo 5), na tentativa de obter um sinal relativo ao Dicofol. No caso do programa Pesticida_2 foi possível identificar um sinal relativo ao Dicofol, a um tempo de retenção bastante elevado (ver Tabela 6.3).

Tabela 6.3 – Resultados obtidos para os programas Pesticida_2 e Pesticida_3

	Pesticida_2		Pesticida_3	
Pesticidas	Tr (min.)	Área	Tr (min.)	Área
Vinclozolina	20,91	8.177.304	24,14	9.188.954
Diclofluanida	21,78	8.909.623	25,16	12.626.878
Procimidona	23,02	1.251.344	26,68	1.250.847
Dicofol	27,80	1.031.251	-	-

Foi usado um novo programa, Pesticida_4 (descrito no Capítulo 5), para confirmar a existência do Dicofol nas amostras e tentar alcançar a melhor separação dos compostos de menor massa molecular (na tentativa de encontrar possíveis produtos de transformação dos pesticidas), mas os resultados obtidos não apontaram no sentido da sua extracção. No entanto, este programa revelou maiores diferenças de resultados para as fibras PDMS e PDMS-DVB, sendo que a fibra PDMS produz sinais mais intensos (ver Tabela 6.4).

Tabela 6.4 – Resultados obtidos para o programa Pesticida_4

		Áreas dos picos		
Pesticidas	Tr (min.)	PDMS	PDMS-DVB	PDMS-CAR
Vinclozolina	27,70	1.918.546	1.928.669	303.005
Diclofluanida	28,73	5.905.476	1.976.138	238.907
Procimidona	30,27	2.749.510	922.262	-
Dicofol	-	-	-	-

De modo a facilitar o processo de extracção e posterior identificação de sinais dos pesticidas, foi experimentada a extracção a temperatura controlada, introduzindo a amostra num banho termostático. A Figura 6.2 mostra o tipo de sistema montado para essa extracção.

Avaliaram-se extracções a temperaturas crescentes, entre 30 e 70° C, utilizando para isso um novo programa cromatográfico, Pesticida_6 (descrito no Capítulo 5). Foi também realizada uma experiência em que a matriz utilizada era vinho, nas mesmas condições dos ensaios anteriores e a 70° C. Os resultados obtidos encontram-se expostos na tabela 6.5.

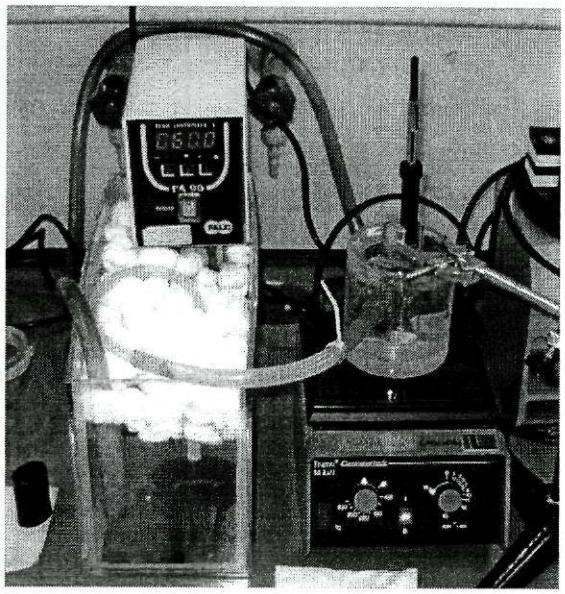


Figura 6.2 – Sistema de extracção termostatizado

Tabela 6.5 – Variação da temperatura de extracção

	Pesticidas			
Ensaio	Dicl	Dico	Proc	Vinc
30° C	4.064.310	206.205	222.652	3.626.464
40° C	10.075.252	931.693	880.048	9.282.658
50° C	15.812.126	1.184.113	1.154.626	16.221.485
60° C	32.283.540	16.251.921	3.422.376	33.851.584
70° C	42.206.140	20.787.028	3.812.451	44.098.704
Vinho 70° C	25.499.810	550.799	696.287	3.926.624

Conclui-se que o aumento da temperatura a que se realiza a extracção leva a um aumento das áreas dos picos obtidos, o que aconteceu para todos os pesticidas analisados. Verificou-se também que o programa testado apresenta melhorias relativamente aos anteriores já que os sinais dos pesticidas se apresentam suficientemente separados para não existirem sobreposições, o tempo de duração do programa não é demasiado longo e os resultados obtidos foram satisfatórios.

No fim deste processo, foi possível identificar os tempos de retenção dos 4 pesticidas utilizados, assim como metodologias para determinar os tempos de retenção das espécies quando se muda de programa cromatográfico. Depois de se ter localizado os sinais relativos aos 4 pesticidas, foi necessário encontrar a forma de quantificar os resultados obtidos, isto é, determinar quais os iões ou conjunto de iões que devem ser utilizados para a determinação da área dos picos, para que se possa obter bons resultados. Essa foi a fase seguinte do trabalho.

6.4.3 Avaliação da forma de aquisição de resultados

A aquisição de dados é um aspecto fundamental num sistema analítico. Se a forma de aquisição dos dados não for de confiança, os resultados obtidos também não serão fiáveis. No caso deste trabalho, os dados a adquirir são espectros de massa das espécies que vão saindo da coluna cromatográfica. Esse espectro de massa não é mais que a contabilização de um conjunto de fragmentos identificados pelas suas razões m/z, como já foi explicado anteriormente. Como cada composto tem o seu espectro de massa característico, é importante determinar qual a parte do espectro de massa que se pretende utilizar para a obtenção dos resultados da experiência efectuada. Convém salientar que, se se optar por utilizar todo o espectro de massa de um determinado pico, pode-se estar a incluir, inconscientemente, alguns interferentes que possuam o mesmo tempo de retenção que a espécie em questão. Uma alternativa é utilizar apenas um ou alguns fragmentos m/z. Se forem escolhidos os fragmentos estatisticamente mais prováveis do espectro de massa da espécie que pretendemos determinar (e que por isso serão os mais intensos num espectro de massa), minimiza-se a hipótese de

interferências. No entanto, perde-se também intensidade de sinal (quando comparamos com o sinal obtido para todo o intervalo de m/z), não se podendo concluir directamente sobre a perda ou não de sensibilidade.

Como se pôde constatar, a escolha da forma de aquisição dos dados em espectrometria de massa é uma matéria particularmente sensível. Por esse motivo, as deduções aparentemente lógicas sobre os fragmentos a utilizar devem ser substituídas por comprovação através de resultados. Deve-se optar por avaliar quais as melhores formas de adquirir os resultados, apoiando os raciocínios necessários para encurtamento do tempo de experiências em referências bibliográficas e do conhecimento do funcionamento do aparelho.

A partir das referências bibliográficas apontadas na revisão bibliográfica e também dos espectros de massa que foi possível obter (Figuras 6.3 a 6.7), foram escolhidos os fragmentos m/z a testar para a aquisição de resultados.

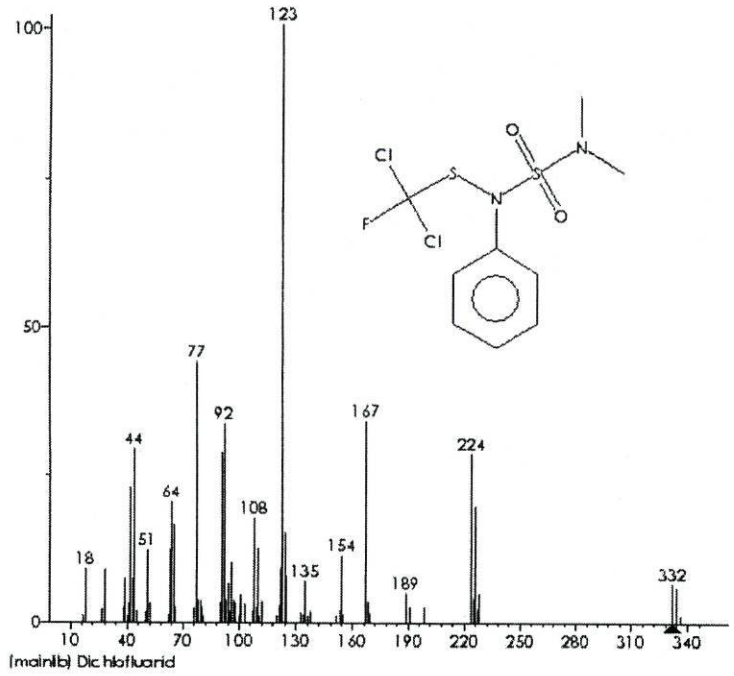


Figura 6.3 – Espectro de massa do Diclofluanida

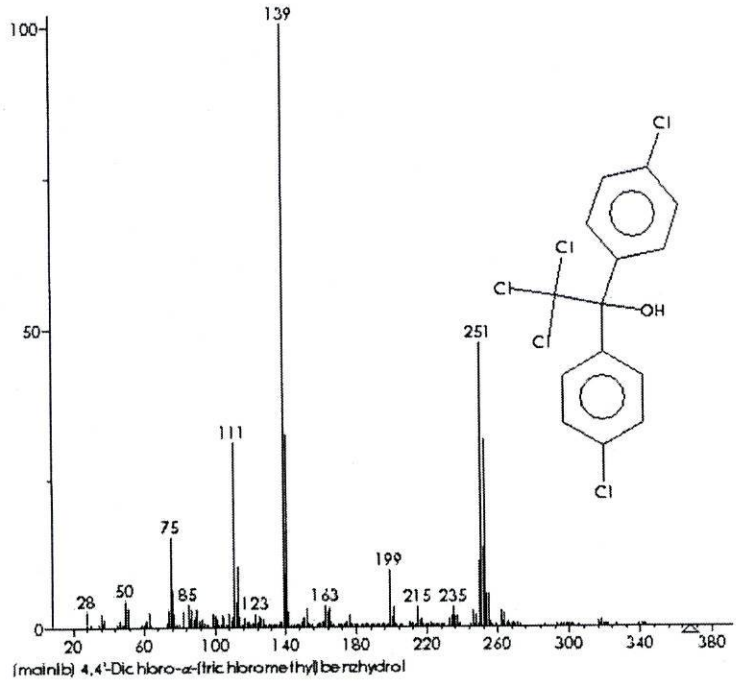


Figura 6.4 – Espectro de massa do Dicofol

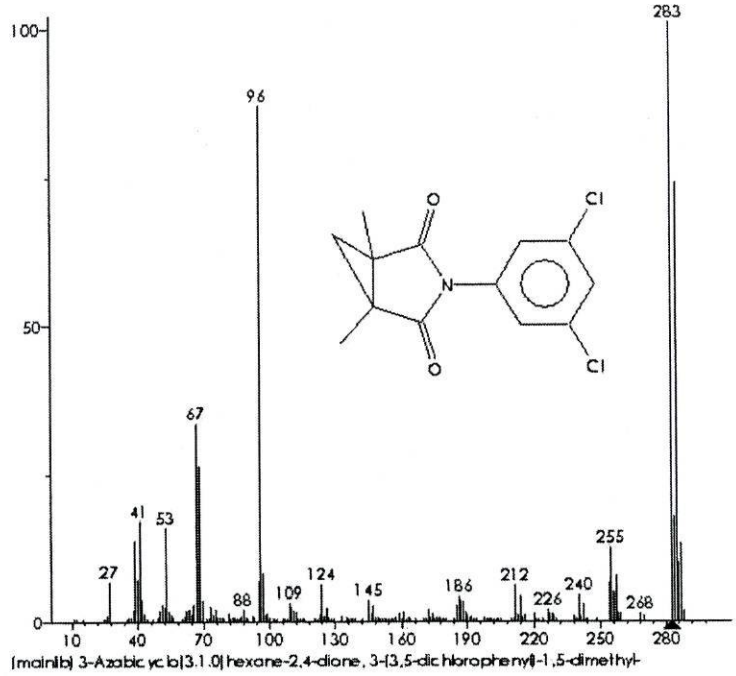


Figura 6.5 – Espectro de massa do Procimidona

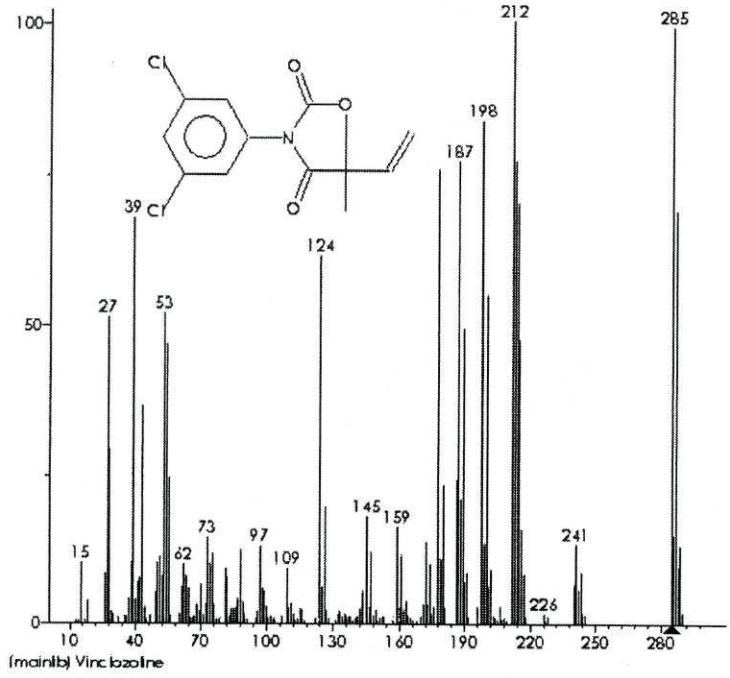


Figura 6.6 – Espectro de massa do Vinclozolina

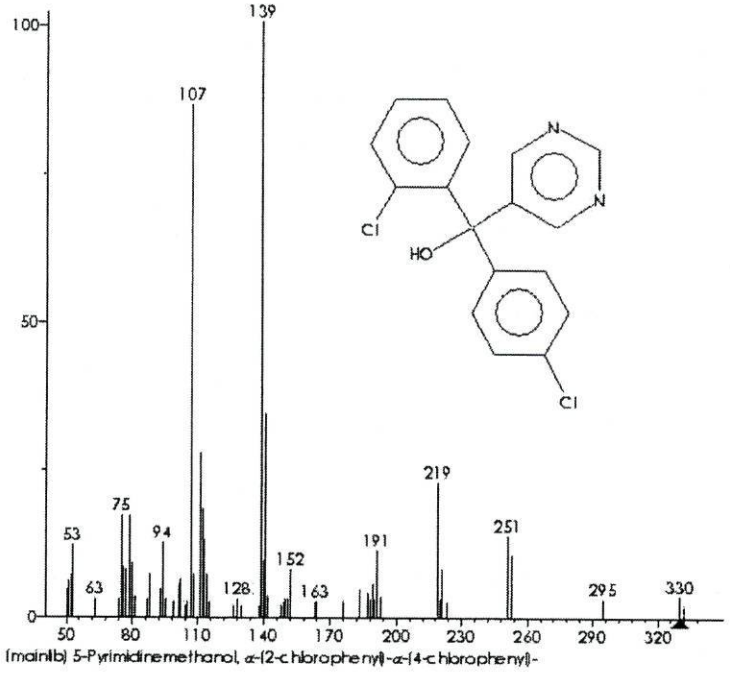


Figura 6.7 – Espectro de massa do Fenarimol

A Tabela 6.6 mostra os iões que foram utilizados na quantificação de cada pesticida. Na tabela acrescenta-se também os dados do Fenarimol, pesticida

que foi incluído no estudo posteriormente. No entanto, foi considerado pertinente incluir esta informação neste local. Assim, e relativamente ao Diclofluanida, escolheu-se apenas o fragmento m/z 123 pois é o mais intenso, o mesmo se passando relativamente ao caso do Procimidona. Relativamente ao Dicofol e ao Fenarimol, os dois iões mais intensos são o 139. Para distinguir os dois pesticidas optou-se por incluir também outro ião. No caso do Dicofol foi o ião 253 porque era um dos iões mais intensos no Dicofol, não o sendo no Fenarimol. Para o Fenarimol escolheu-se o ião 107 por ser o segundo ião mais intenso. Finalmente, para o Vinclozolina optou-se pelos iões 212 e 198 por serem dois dos iões mais intensos e conforme sugestão de Navarro et all. [31].

Tabela 6.6 – Lista dos fragmentos m/z utilizados na quantificação dos pesticidas.

Pesticida	Fragmentos m/z
Diclofluanida	123
Dicofol	139 + 253
Fenarimol	139 + 107
Procimidone	283
Vinclozolina	212 + 198

6.4.4 Melhoramento do método analítico

Um método analítico necessita de ser optimizado para que possa produzir bons resultados, entre outros aspectos, em termos de precisão e de exactidão. Para isso é necessário determinar quais os parâmetros do método que são mais importantes para a resposta deste e estudar a forma como a variação desses parâmetros influencia a resposta do método para proporcionar características mais próximas das intenções do operador. A primeira dificuldade é determinar quais são os parâmetros importantes, a que se vem juntar uma dificuldade adicional, por vezes ainda maior, que é definir qual a medida de qualidade de resposta do sistema que queremos melhorar. No caso do método em questão, a resposta não foi definida inequivocamente. Como se trata da análise de 5 pesticidas, que produzem diferentes sinais a tempo de retenção diferentes, pretendeu-se obter picos com áreas maiores, que foram

calculadas a partir dos fragmentos m/z indicados acima e utilizando as capacidades do programa cromatográfico, e também a melhor separação e resolução dos respectivos picos. Por esse motivo, pode-se dizer que a resposta que está a ser melhorada é um pouco empírica.

O melhoramento foi alcançado através da variação de cada parâmetro de forma individual (optimização univariada). Este não será o melhor processo de alcançar o óptimo do sistema mas, devido à complexidade do procedimento e à longa duração deste, foi a forma encontrada para melhorar o método.

O programa utilizado em toda a fase de melhoramento do método foi o Pesticida_6.

Importa também referir que, aquando do melhoramento do método, ainda não estava totalmente definida qual a lista de pesticidas a ser estudada. Já era possível prever que se iria utilizar os pesticidas Diclofluanida, Dicofol, Fenarimol, Procimidona e Vinclozolina, mas os restantes pesticidas ainda não tinham sido estabelecidos. Foi necessário reunir com os responsáveis pela Quinta de Azevedo para decidir a lista, mas essa reunião só teve lugar mais tarde. Assim, o melhoramento foi realizado utilizando apenas estes 5 pesticidas, e posteriormente seria verificado se os restantes pesticidas a estudar eram detectados pelo método.

O primeiro parâmetro que foi melhorado foi o revestimento da fibra. Estavam disponíveis 3 revestimentos diferentes e foi decidido escolher a fibra que produz picos mais elevados, já que é importante que o método consiga atingir limites de detecção baixos. Assim, foi feito um ensaio para determinar qual a fibra que produz os melhores resultados, obtendo-se os resultados descritos na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 – Avaliação da área dos picos para as diferentes fibras

	Revestimento da fibra		
Pesticida	PDMS	PDMS-DVB	PDMS-CAR
Diclofluanida	30.001.308	2.159.176	148.222
Dicofol	12.984.360	74.691	-
Procimidona	11.804.508	3.143.494	35.152
Vinclozolina	21.782.022	1.608.760	94.960

Como se pode ver, os sinais obtidos para a fibra com revestimento de Polidimetilsiloxano (PDMS) são bastante superiores aos obtidos pelas restantes fibras. Decidiu-se, portanto, continuar o estudo utilizando esse tipo de fibra.

Para além do revestimento da fibra, de acordo com a literatura de SPME [25] os parâmetros mais importantes para a resposta do método são o tempo e temperatura de extracção, a adição de cloreto de sódio e a adição de sulfito de sódio. Não se considerou o volume de amostra como um parâmetro importante pois seria necessário entrar com outro tipo de considerações, que introduziriam maior complicação no avanço do melhoramento do método. Foi também decidido que a extracção seria realizada em headspace pois apresenta vantagens consideráveis em relação à imersão da fibra na amostra por causa dos efeitos de matriz. Assim, o volume de amostra/solução utilizado em cada ensaio foi sempre de 10,00 ml e a extracção realizada em headspace. Os ensaios foram geralmente realizados em água excepto quando mencionado o contrário.

Os primeiros ensaios para melhorar o método tinham como objectivo variar alguns parâmetros e verificar qual a resposta do sistema. Assim, a Tabela 6.8 mostra os resultados para vários ensaios em que se variaram os parâmetros temperatura de extracção, tempo de extracção e adição de cloreto de sódio. A concentração de pesticidas usada foi de 10 ppb, de forma estudar o sistema a concentrações mais baixas do que as pretendidas.

Tabela 6.8 – Resultados da variação inicial de parâmetros

		Pesticidas				
Parâmetros	Ensaio	Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
40° C; 20 minutos	1	507.058	45.244	144.575	51.129	-
50° C; 5 minutos	2	222.051	19.020	94.748	44.593	-
50°C; 20 minutos; 0,50 g NaCl	3	1.580.219	207.395	2.278.816	363.983	-
60°C; 20 minutos	4	813.149	137.999	941.921	923.414	-

Observando os resultados obtidos, verifica-se que o aumento da temperatura aumenta a área dos picos obtidos (ensaios 1 e 4) e que o aumento do tempo de extracção conjugado com a adição de cloreto de sódio também tem o mesmo resultado, mas de forma bastante mais acentuada (ensaios 2 e 3).

Após ter testado vários parâmetros do sistema ao mesmo tempo, importa estudar isoladamente cada um. Para isso, foram realizadas experiências em que se varia a temperatura de extracção (Tabela 6.9). Nesses ensaios, utilizou-se um tempo de extracção de 20 minutos, com adição de 0,50 g de cloreto de sódio e uma concentração de pesticidas de 5 ppb.

Tabela 6.9 – Variação da temperatura de extracção

		Pesticidas				
Temperatura extracção	Ensaio	Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
40° C	1	354.647	44.310	108.634	156.952	-
60° C	2	1.121.818	153.940	328.088	1.304.959	3.526
70° C	3	1.625.913	191.845	632.428	2.109.470	-
80° C	4	1.569.428	95.230	1.259.470	2.592.925	27.920

Observa-se que as áreas dos picos aumentam com a temperatura de extracção, embora a 80° C, alguns dos pesticidas apresentam já áreas menores. Este facto pode dever-se a que a temperatura seja demasiado elevada, não favorecendo a extracção mas sim a desadsorção de algumas espécies. Foi possível também observar que ocorriam alguns problemas de circulação de água no sistema termostático a temperaturas superiores a 70° C. Atendendo a esses motivos, decidiu-se limitar o estudo da temperatura de extracção até à temperatura de 70° C.

Nos ensaios seguintes, pretendeu-se estudar a adição de cloreto de sódio e de sulfito de sódio. Estes dois sais foram utilizados para estudar a variação da força iónica da amostra. O sulfito de sódio tem uma vantagem adicional, que é a capacidade de eliminar as espécies de enxofre que possam existir na amostra e que podem provocar uma banda interferente nos cromatogramas. A razão de ser de se utilizar o sulfito é porque durante o crescimento das uvas, e até à vindima, são aplicados produtos com enxofre. A temperatura de

extracção escolhida foi 50° C, durante 20 minutos e com uma concentração de 20 ppb. A concentração utilizada foi mais elevada pois era já conhecido o efeito de diminuição de sinal provocado pela utilização do sulfito.

Tabela 6.10 – Estudo da adição de cloreto de sódio e sulfito de sódio

		Pesticidas				
Parâmetros	Ensaio	Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
Normal	1	73.421	12.976	6.484	6.732	-
0,50 g NaCl	2	130.969	59.110	10.570	27.706	-
0,50 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	3	5.002	3.361	6.440	-	-
0,50 g Na2SO3	4	4.157	2.700	3.812	-	-
1,00 g NaCl	5	131.126	41.755	8.677	-	-
1,00 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	6	4.640	8.831	4.215	-	-
1,50 g NaCl	7	243.226	95.371	24.019	21.717	-
1,50 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	8	-	2.833	-	954	-

Como se pode verificar pelos resultados obtidos (Tabela 6.10), a adição de cloreto de sódio provoca um aumento das áreas dos picos, enquanto a adição de sulfito de sódio provoca uma diminuição.

A adição de cloreto de sódio facilita a extracção dos pesticidas, em consequência da alteração da força iónica da solução, o que desloca o equilíbrio dos pesticidas entre a solução e o headspace para o sentido do headspace. Observando os ensaios 1, 2, 5 e 7, em que se aumenta a concentração do cloreto de sódio nas amostras, nota-se um aumento dos picos dos pesticidas de uma forma geral. Se for também adicionado o sulfito de sódio, o comportamento do método não é tão linear, sendo que em alguns casos, os picos dos pesticidas chegam a não aparecer.

Nos ensaios seguintes, foi estudado novamente a temperatura de extracção mas desta vez em conjunto com o tempo de extracção. Foi utilizada uma concentração de 20 ppb, com adição de 1,00 g de cloreto de sódio e 0,50 g de sulfito de sódio.

Dos resultados obtidos para o estudo da temperatura e do tempo de extracção (Tabela 6.11), retira-se que o aumento da temperatura de extracção até aos 60° C se traduz num aumento geral das áreas dos picos, mas o

aumento posterior para 70° C já não produz efeitos vantajosos. Em alguns casos (ensaios 5 e 8), alguns dos picos não aparecem.

Tabela 6.11 – Estudo da temperatura e tempo de extracção

		Pesticidas				
Parâmetros	Ensaio	Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
40° C; 20 minutos	1	1.901	994	2.892	-	-
50° C; 20 minutos	2	1.109	4.202	5.082	568	-
60°C; 20 minutos	3	2.340	5.298	5.459	-	-
70°C; 20 minutos	4	1.370	21.898	379	-	-
70°C; 5 minutos	5	947	4.145	7.622	-	-
70° C; 50 minutos	6	1.479	16.350	850	-	-
70°C; 30 minutos	7	1.144	1.171	-	-	-
70°C; 40 minutos	8	-	-	-	-	-

Assim, concluiu-se que a temperatura de extracção mais vantajosa seria a de 60° C e uma duração de extracção de 20 minutos.

Por outro lado, o facto dos sinais obtidos serem relativamente baixos quando comparados com os do ensaio anterior (Tabela 6.10), apesar das concentrações dos pesticidas serem semelhantes, deve-se fundamentalmente à adição de sulfito de sódio.

Noutro ensaio realizado para avaliar os efeitos da adição do sulfito às amostras (Tabela 6.12), verificou-se que, apesar de serem utilizados os valores mais vantajosos para os parâmetros estudados (temperatura de extracção de 60° C, durante 20 minutos, adição de cloreto de sódio e uma concentração de pesticidas na ordem dos 20 ppb), a presença do sulfito provoca uma grande diminuição dos sinais obtidos.

Tabela 6.12 – Estudo da adição do sulfito de sódio

		Pesticidas				
Parâmetros	Ensaio	Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
1,50 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	1	3.026	5.196	22.260	-	-
1,50 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	2	2.022	4.419	3.195	-	-
2,00 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	3	4.059	1.792	1.891	-	-
2,00 g NaCl; 0,50 g Na_2SO_3	4	1.531	6.704	3.302	-	-
2,00 g NaCl	5	1.097.163	388.228	247.088	699.257	4.359
2,00 g NaCl	6	778.212	264.525	102.459	169.568	-

Pode-se ainda afirmar que não se verificou uma melhoria da resolução dos picos obtidos. Posteriormente, também se verificou que não ocorria a interferência do enxofre pelo que o estudo do sulfito de sódio foi dado como terminado, concluindo que não existe interesse na sua utilização dado que produz uma diminuição acentuada dos picos, sem qualquer contrapartida vantajosa.

Depois de reduzir a área de procura da melhor resposta do sistema foi implementada uma optimização univariada. Os parâmetros estudados foram a temperatura de extracção, tempo de extracção e a quantidade de cloreto de sódio adicionada. Inicialmente testou-se a melhor temperatura de extracção, mantendo os restantes parâmetros nos seus valores iniciais (tempo de extracção de 30 minutos e 2,00 g de cloreto de sódio). Depois de se encontrar a melhor temperatura de extracção, procurou-se o melhor tempo de extracção, utilizando o valor inicial do cloreto de sódio adicionado mas o melhor valor encontrado para a temperatura de extracção. Finalmente, após ter encontrado o melhor tempo de extracção, procura-se a melhor quantidade de cloreto de sódio a adicionar, mantendo os melhores valores do tempo e temperatura de extracção anteriormente encontrados. Os resultados encontram-se na Tabela 6.13.

Tabela 6.13 – Melhoramento final do método

Parâmetros	Ensaio	Pesticidas				
		Vinc	Dicl	Proc	Dico	Fena
60ºC; 30 minutos; 2,00 g NaCl	1	17.861	-	-	-	-
50ºC; 30 minutos; 2,00 g NaCl	2	9.406	-	-	-	-
45ºC; 30 minutos; 2,00 g NaCl	3	7.846	-	-	-	-
60ºC; 40 minutos; 2,00 g NaCl	4	49.515	5.001	11.677	-	-
60ºC; 20 minutos; 2,00 g NaCl	5	29.666	-	3.275	-	-
60ºC; 40 minutos;3,00 g NaCl	6	62.225	6.223	11.835	-	-
60ºC; 40 minutos; 4,00 g NaCl	7	78.295	5.355	10.696	-	-

Como se pode verificar pela Tabela 6.13, a melhor temperatura encontrada foi 60º C (ensaios 1 a 3). Não foi possível utilizar temperaturas superiores devido aos problemas do sistema de termostatização já referidos. Após ter encontrado a temperatura de extracção, passou-se ao tempo de extracção. Neste caso, optou-se por não utilizar tempos de extracção demasiado longos (inferiores a 40 minutos) para permitir um maior número de ensaios realizados por dia. Para os tempos de extracção testados (20, 30 e 40 minutos), concluiu-se que os melhores resultados são obtidos para 40 minutos (ensaios 1, 4 e 5). Finalmente, relativamente ao estudo da adição de cloreto de sódio (ensaios 5 a 7), verificou-se que a adição de cloreto de sódio se traduzia num grande aumento do sinal para o Vinclozolina, mas o mesmo não acontecia para os restantes pesticidas. Como a adição de uma quantidade muito maior de cloreto de sódio não se traduzia em aumento significativo da área dos sinais encontrados, decidiu-se manter o valor de 2,00 g de cloreto de sódio.

O método final apresenta melhorias em relação aos iniciais, já que intensidade dos sinais é superior, podendo deduzir-se que a sensibilidade seja por isso também superior, e também porque se conseguem identificar mais pesticidas.

6. 5 Caracterização do método analítico

Após ter realizado o melhoramento de um método analítico, importa fazer uma caracterização deste, de forma a encontrar as suas figuras de mérito essenciais e conhecer as suas capacidades e limitações.
Antes de partir para a caracterização do método proposto, é feita a descrição completa do procedimento utilizado.

6.5.1 Descrição geral do método

O método analítico proposto tem como propósito a quantificação de alguns pesticidas em amostras de sumo de uva, uvas esmagadas e em diversos tipos de matriz que ocorrem na produção de um vinho, desde o sumo de uva até ao produto final. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com espectrómetro de massa acoplado, sendo a extracção dos componentes essenciais da amostra realizada a partir de microextracção em fase sólida, com uma fibra de Polidimetilsiloxano, com um revestimento de 100 µm de espessura. O método de extracção consistiu na adição de 5,00 ml de água desionizada a 5,00 ml de amostra e ainda 2,00 g de cloreto de sódio, num frasco com capacidade para 22 ml. Antes de fechar o frasco, introduzia-se uma barrinha magnética com 15 mm de comprimento. O frasco era depois mergulhado num banho a 60° C, promovendo a agitação da solução com a amostra através da rotação da barrinha já referida, a uma velocidade de 1400 rotações por minuto. Depois da temperatura da amostra se encontrar termostatizada, a fibra era introduzida no frasco, ficando exposta ao headspace durante 40 minutos. A fibra foi sempre utilizada na posição de 3 cm de profundidade do suporte para que a profundidade da fibra no headspace e no injector seja sempre a mesma. Após esse período de extracção, a fibra era introduzida no injector do GC-MS, que se encontrava a 250° C, ocorrendo uma fase de desadsorção, que durava 10 minutos. A descrição do programa cromatográfico encontra-se no capítulo 5 (programa Pesticida_6).

Importa referir que a diluição a metade foi utilizada para reduzir os efeitos de matriz. A diluição pode ser realizada em maior extensão se tal for necessário,

de forma a ajustar o nível de concentrações analisado ao nível ideal do método.

6.5.2 Caracterização do método

Nesta secção vai ser feita a caracterização do método proposto, tendo em conta as suas figuras de mérito principais, tais como a sensibilidade, a precisão e os limites de quantificação.

A caracterização do sistema foi realizada utilizando como amostras vinho produzido na Quinta de Azevedo. Não foi possível utilizar outro tipo de amostra já que as uvas ainda não estavam suficientemente maduras para permitir a produção de um vinho, recolhendo amostras ao longo do processo de vinificação nem foi possível obter essas amostras de outra forma.

A caracterização do método foi feita atendendo à calibração no intervalo de concentrações de 10 a 200 ppb de cada pesticida, a avaliação de precisão a 10, 30 e a 100 ppb e determinando o limite de quantificação. Em todos os ensaios foram utilizadas amostras com todos os pesticidas que foram posteriormente estudados (Diclofluanida, Dicofol, Fenarimol, Procimidona e Vinclozolina). De notar o estudo do Fenarimol, que não tinha sido ainda referido.

6.5.2.1 Avaliação da sensibilidade e calibração

A calibração foi realizada entre 10 e 200 ppb, de forma a avaliar níveis de concentração desde valores inferiores ao pretendido (30 ppb) até concentrações mais elevadas. A sensibilidade foi avaliada a partir do declive da recta que se pode traçar com os pontos obtidos e a existência de linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação linear (r) calculado para os mesmos pontos.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.14 e na Figura 6.8. Não se encontrou qualquer sinal relativo ao Fenarimol, mesmo a concentrações mais elevadas, o que provavelmente se deve a efeitos de matriz. No entanto, em análises realizadas com amostras de uvas esmagadas foi possível encontrar o

seu sinal, pelo que este facto pode ocorrer apenas nas amostras de vinho e não nas restantes amostras que serão recolhidas durante a produção do vinho.

Tabela 6.14 – Calibração do método

Pesticida	Vinclozolina	Diclofluanida	Procimidona	Dicofol	Fenarimol
Tr (min)	24,15	25,17	26,68	32,21	34,21
Iões (m/z)	212+198	123	283	139+253	139+107
Conc. (ppb)	Áreas do picos encontrados				
0	0	0	0	0	
10	3.118.410	628.318	253.678	955.232	
20	4.988.585	923.459	389.941	1.138.393	
30	7.174.844	1.477.565	551.917	2.010.403	
40	6.986.651	1.523.532	629.056	1.681.850	
60	12.211.555	2.058.064	964.866	2.760.252	
80	9.380.539	1.575.722	674.541	2.719.984	
100	13.401.854	2.201.408	1.068.223	5.046.862	
120	11.319.457	1.716.367	890.658	2.374.273	
160	14.587.170	2.552.181	1.474.939	5.122.342	
200	13.247.784	2.841.850	1.464.803	8.451.526	

Analisando os gráficos da intensidade do sinal em função da concentração para os pesticidas (Figura 6.9), verifica-se que o comportamento do método é aproximadamente linear acima de 10 ppb e até cerca dos 100 ppb. Acima destes valores ocorre uma diminuição da sensibilidade do sistema, que pode ser explicada pela hipotética saturação do revestimento da fibra, o que reduziria a capacidade de extracção dos analitos. Este facto é realçado na Tabela 6.15, em que se encontram os declives das rectas relativas à resposta de cada pesticida.

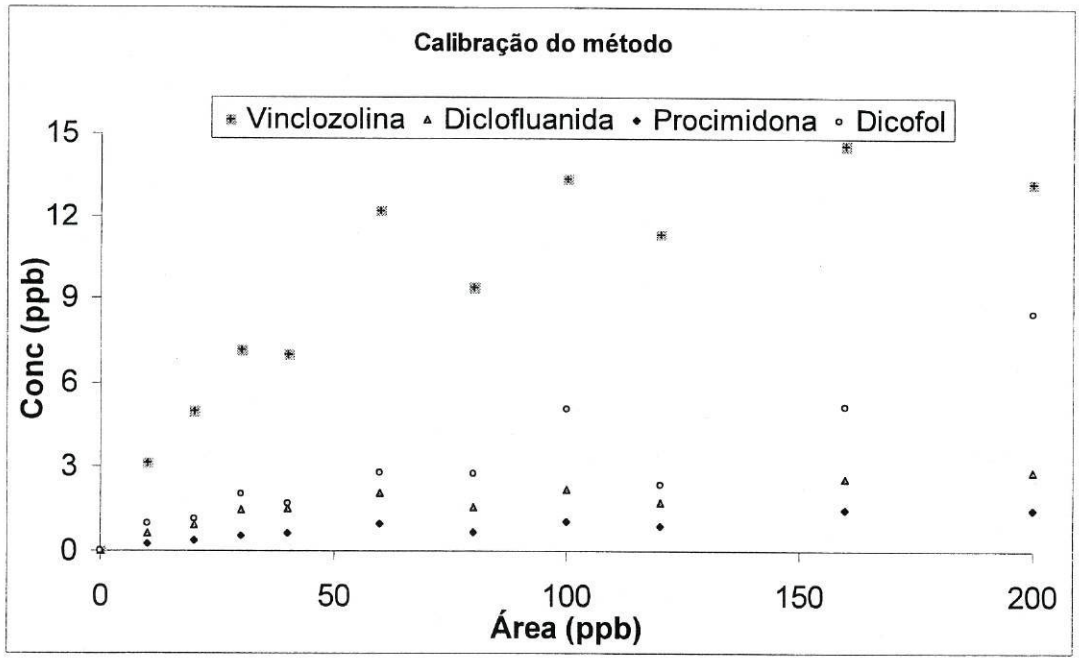


Figura 6.8 – Gráfico da calibração do método

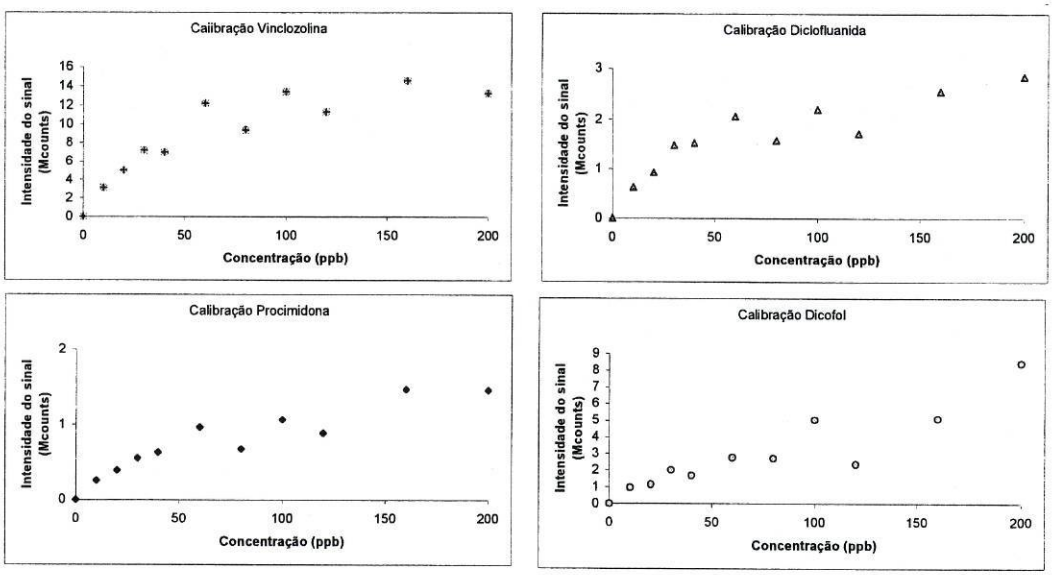


Figura 6.9 – Calibrações individuais dos pesticidas

Tabela 6.15 – Avaliação da linearidade da resposta do método

Vinclozolina	Diclofluanida	Procimidona	Dicofol	Fenarimol	
24,15	25,17	26,68	32,21	34,21	
212+198	123	283	139+253	139+107	
10 a 80 ppb					
104.229	15.322	7.456	27.199		Declive
3.140.918	751.552	279.090	789.738		Ord. Origem
0,84777	0,78353	0,79005	0,92465		r
10 a 100 ppb					
102.945	14.669	7.801	39.388		Declive
3.180.172	771.510	268.545	417.275		Ord. Origem
0,90890	0,85691	0,88029	0,93335		r
100 a 200 ppb					
10.401	8.917	5.483	43.255		Declive
11.630.923	1.034.946	429.570	-3.012.270		Ord. Origem
0,34100	0,81610	0,83189	0,79239		r
Toda a recta					
52.703	9.718	6.175	33.478		Declive
5.320.069	952.980	329.890	480.883		Ord. Origem
0,84707	0,89323	0,93352	0,90633		r

Pode-se observar que o declive acima de 100 ppb é menor que o obtido para concentrações menores, à excepção do Dicofol.

No caso do Vinclozolina, os declives das rectas até 80 ppb e até 100 ppb são semelhantes, sendo que o coeficiente de correlação linear até 100 ppb é um pouco melhor. Acima dos 100 ppb, deixa de existir uma tendência linear e a sensibilidade diminui bastante.

Relativamente ao Diclofluanida, a tendência linear é mais acentuada até aos 100 ppb, sendo que acima desse valor, o declive da recta diminui, não ocorrendo no entanto uma diminuição significativa do coeficiente de correlação linear. Assim, o melhor valor de r foi encontrado quando se utiliza todos os pontos da calibração.

O Procimidona tem um comportamento semelhante ao Diclofluanida, já que o melhor coeficiente de correlação é obtido quando se inclui todos os pontos da calibração.

Finalmente, para o caso do Dicofol, os resultados são mais lineares abaixo dos 100 ppb, apesar de ser mais sensível acima desse valor, mas com menor tendência linear.

Para finalizar a avaliação da sensibilidade, o método é, de maneira geral, mais sensível abaixo dos 100 ppb. De qualquer forma, é possível ajustar as

concentrações das amostras para o intervalo de concentrações ideal por intermédio da diluição destas.

6.5.2.2 Precisão do método

A avaliação da precisão do método foi feita através da repetição de ensaios nas mesmas condições. Foram efectuados 3 ensaios para cada nível de concentrações, 10, 30 e 100 ppb. Cada injecção continha todos os pesticidas pelo que a extracção deles foi simultânea e hipoteticamente concorrente. Foram escolhidos estes valores de concentração para que se possa avaliar o nível de concentração pretendido (30 ppb) e também concentrações inferiores e superiores.

Os resultados obtidos para a repetibilidade do método encontram-se na Tabela 6.16. A Tabela 6.17 mostra os valores calculados para o desvio-padrão relativo dos ensaios (RSD) e o desvio-padrão (SD), para cada nível de concentrações e pesticida.

Tabela 6.16 – Resultados da avaliação da precisão do método

		10 ppb		
Pesticida	Tr (min)	1	2	3
Vinclozolina	24,14	4.481.269	3.204.247	1.605.471
Diclofluanida	25,17	807.506	574.747	15.411.291
Procimidona	26,68	338.384	237.036	84.690
Dicofol	32,21	362.768	140.229	15.234
Fenarimol	34,21	-		
		30 ppb		
Pesticida	Tr (min)	1	2	3
Vinclozolina	24,14	5.712.326	7.629.178	7.379.023
Diclofluanida	25,17	1.050.320	1.422.520	1.287.000
Procimidona	26,68	448.514	621.725	549.681
Dicofol	32,21	315.193	716.708	504.823
Fenarimol	34,21			
		100 ppb		
Pesticida	Tr (min)	1	2	3
Vinclozolina	24,14	15.411.291	15.295.696	14.247.269
Diclofluanida	25,17	2.064.491	1.950.761	1.697.676
Procimidona	26,68	1.087.860	1.048.008	868.313
Dicofol	32,21	3.042.132	3.367.311	2.315.002
Fenarimol	34,21			

Tabela 6.17 – Avaliação da precisão do método

		Média			RSD (%)			SD		
Pesticida	Tr (min)	10 ppb	30 ppb	100 ppb	10 ppb	30 ppb	100 ppb	10 ppb	30 ppb	100 ppb
Vinclozolina	24,14	3.096.996	6.906.842	14.984.752	47	15	4	1.440.896	1.042.016	641.289
Diclofluanida	25,17	5.597.848	1.253.280	1.904.309	152	15	10	8.499.488	188.377	187.767
Procimidona	26,68	220.037	539.973	1.001.394	58	16	12	127.698	87.013	116.961
Dicofol	32,21	172.744	512.241	2.908.148	102	39	19	176.034	200.860	538.797
Fenarimol	34,21									

Como se pode verificar pelas Tabelas 6.16 e 6.17, os desvios a 10 ppb são substancialmente superiores ao dos outros níveis de concentração. Este facto pode ser considerado natural pois, como os sinais encontrados são muito mais pequenos, as variações de área obtidas traduzem-se em erros maiores e também porque, como as quantidades são menores, as variações de extracção são mais significativas. Importa referir os casos do Diclofluanida e do Dicofol, em que os resultados obtidos para a concentração de 10 ppb, no 3º ensaio, são bastante diferentes dos restantes. Acontece que se optou por referir os 3 valores obtidos, apesar desse 3º valor ser manifestamente errado, pois não faria sentido calcular o desvio-padrão apenas com dois valores. Por outro lado, esses dois resultados demonstram as dificuldades por vezes sentidas em obter respostas reprodutíveis. O mesmo se aplica às médias, desvios-padrão e desvios-padrão relativos posteriormente calculados.

Avaliando os desvios a 30 ppb, eles são semelhantes para o Vinclozolina, Diclofluanida e Procimidona. Apenas o Dicofol apresenta um desvio bastante superior. Já a 100 ppb, os valores dos desvios são considerados aceitáveis, mesmo o do Dicofol, já que ao erro inerente à utilização do SPME temos de acrescentar o facto de se estar a trabalhar com uma matriz complexa, o que afecta consideravelmente a precisão do método.

De forma geral, o pesticida com melhor precisão é o Vinclozolina. A esse facto não é alheio a extracção ser a mais extensa, já que as concentrações de todos os pesticidas são iguais, o que torna o efeito das discrepâncias de resultados mais atenuado. Os valores de precisão encontrados para o Diclofluanida e para o Procimidona são bastante semelhantes enquanto a precisão para o Dicofol é bastante menor que os restantes. As dificuldades na extracção do Dicofol podem justificar esta diferença, já que foram sentidas ao

longo de todo o processo de melhoramento do método, podendo não estar totalmente superadas.

6.5.2.3 Limites de quantificação

O limite de quantificação é a quantidade mínima de analito que deve estar presente para que o sinal obtido possa ser considerado significativamente diferente do ruído de fundo do sistema.

Uma forma de avaliar o limite de quantificação ou de determinação de um método é através da repetibilidade do sinal do ruído de um ensaio branco [53]. No caso do método proposto, tal não é possível, pois, como se utiliza apenas alguns fragmentos para a quantificação, se o pesticida não estiver presente na amostra analisada, a área obtida para o tempo de retenção de qualquer pesticida é invariavelmente igual a zero. Por esse motivo foi necessário determinar os limites de outra forma, utilizando o mesmo raciocínio estatístico. Assim, utilizou-se a capacidade do programa cromatográfico de fornecer informação relativamente à razão sinal/ruído em cada ponto do cromatograma. A partir desse valor, obtido para cada pesticida, calcularam-se os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada pesticida e em matrizes diferentes (Tabela 6.18). O cálculo foi feito de forma a encontra a concentração de pesticida a que correspondia uma razão sinal/ruído igual a 3 para o LD e uma razão igual a 10 para o LQ.

Como se pode observar, os limites calculados para as uvas esmagadas são muito superiores aos obtidos para água ou vinho. Este facto pode ser explicado pela dificuldade de homogeneização das amostras e da presença de várias partículas sólidas, como as graínhas. Verifica-se também que o Fenarimol é afectado fortemente pela alteração da matriz, já que tem um limite de detecção de 2,5 ppb em água mas em uvas é muito superior, não sendo sequer possível quantificá-lo em amostras de vinho. Relativamente aos restantes pesticidas, os limites de detecção e quantificação encontrados estão dentro dos valores esperados, pelo que o método mostra ser capaz de realizar a tarefa de quantificar os pesticidas ao longo da vinificação.

Tabela 6.18 – Limites de detecção e de quantificação para os vários pesticidas, em diferentes matrizes

Matriz	Pesticida	LD (ppb)	LQ (ppb)
Água	Vinclozolina	0,909	3,030
	Diclofluanida	2,791	9,302
	Procimidone	4,138	13,793
	Dicofol	0,053	0,175
	Fenarimol	2,500	8,333
Vinho	Vinclozolina	0,160	0,533
	Diclofluanida	0,989	3,297
	Procimidone	2,571	8,571
	Dicofol	0,174	0,581
	Fenarimol	-	-
Uvas esmagadas	Vinclozolina	70,588	235,294
	Diclofluanida	19,672	65,574
	Procimidone	52,174	173,913
	Dicofol	218,182	727,273
	Fenarimol	266,667	888,889

6.5.3 Espécies identificadas

Tendo sido feita a descrição e caracterização do método, importa também fazer uma descrição das espécies que podem ser identificadas por ele. Como o método foi desenvolvido no sentido de ser utilizado na identificação e quantificação de pesticidas presentes em uvas e no vinho, é importante avaliar se este consegue identificar um grande número de pesticidas que são correntemente utilizados na vinha. Assim, foram utilizados padrões de vários pesticidas aplicados nas vinhas da Quinta de Azevedo durante a época de crescimento e maturação das vinhas e também em épocas anteriores, de forma a ser possível identificar a sua eventual presença. Os pesticidas utilizados nesse processo de investigação faziam parte da listagem da Protecção Integrada, pelo que o método se torna especialmente adaptado para a identificação de pesticidas dentro desse regime. Foram também utilizados padrões de vários pesticidas organoclorados, cuja aplicação se encontra proibida. O método será portanto capaz de identificar vários pesticidas que são

utilizados nas vinhas assim como vários pesticidas que se encontram proibidos, e que não devem surgir nas análises efectuadas.

A Tabela 6.19 apresenta o conjunto de pesticidas utilizados para identificar os sinais e tempos de retenção para o método proposto. Todos estes compostos foram identificados a partir da análise dos respectivos padrões e por isso pode-se ter uma grande certeza sobre os seus tempos de retenção. Os nomes apresentados aparecem exactamente como indicados pelo programa cromatográfico, de forma a não introduzir erros de tradução, já que não foi possível encontrar os nomes em português para vários casos.

Tabela 6.19 – Lista de pesticidas identificáveis pelo método proposto

Tempo de retenção (minutos)	Espécie
21,86	Alpha Lindane
23,50	Delta Lindane
24,15	Vinclozolin
25,17	Dichlofluanid
25,26	Chlorpyrifos
25,73	Aldrin-R
26,49	Isodrin
26,69	Procymidone
27,02	Folpet
27,42	Iprodione
27,75	Endosulfan
28,49	Dieldrin
29,19	Endrin
29,27	Mitotane
29,40	Endosulfan II
30,35	o,p'-DDT
30,45	Endosulfan Sulfate
31,64	Myclobutanil
31,88	Methoxychlor
32,07	Endrin ketone
32,20	Dicofol
32,92	Phosalone
34,21	Fenarimol

Verifica-se assim que o método é capaz de identificar bastante mais pesticidas do que aqueles que são objectos de estudo. Desta forma, se existirem outros pesticidas, que não aqueles que são estudados, nas uvas e a sua concentração for superior ao limite de detecção do método, este deverá ser capaz de o mostrar claramente. No entanto, deverá ser referido que o método não é capaz de identificar todos os pesticidas referidos num único ensaio. Há pesticidas com extensão de extracção bastante elevadas, como por exemplo o

Clorpirifos, e que dificultam a extracção dos restantes pesticidas. Este aspecto foi bem patente em ensaios incluindo esse pesticida em conjunto com outros, já que os sinais dos restantes pesticidas diminuíam bastante as suas intensidades ou até deixavam de apresentar sinal, só porque o Clorpirifos se encontrava na amostra. Nesses casos, verificava-se um sinal relativo ao Clorpirifos bastante intenso, muitas vezes apresentando sinais de saturação do método.

Por outro lado, utilizando as capacidades da espectroscopia de massa e do seu sistema de identificação de sinais, é possível identificar diversas espécies através dos sinais obtidos, sem que se usem padrões para o efeito, e com um grau de confiança relativamente elevado. Esta forma de identificação foi também utilizada para a caracterização do método, especialmente nos casos em que um dado sinal aparece repetidamente, com o mesmo tempo de retenção. Quando isto acontece, o grau de confiança com que se pode extrair esta informação é substancialmente acrescido.

Os produtos de degradação dos pesticidas podem ser mais tóxicos e perigosos do que os próprios pesticidas, o que torna muitas vezes importante a sua identificação e quantificação. Como foram utilizados bastantes pesticidas durante os ensaios e o número de pesticidas em estudo é relativamente grande, não foi possível obter padrões dos seus produtos de degradação. Como já foi referido, utilizando as capacidades da espectrometria de massa é possível identificar, com um grau de confiança razoável, os produtos de degradação dos pesticidas. A Tabela 6.20 apresenta a lista de outras espécies (produtos de degradação ou outras espécies que, apesar de não ter sido possível encontrar referências à sua proveniência, apareciam persistentemente nos cromatogramas dos ensaios realizados) identificadas a partir desse procedimento.

Para sistematizar as informações, considerou-se importante englobar todas as espécies identificadas pelo método proposto numa única tabela, independentemente do uso de padrões para essa identificação. Assim, ficam registadas todas as espécies identificadas e respectivos tempos de retenção (Tabela 6.21).

Tabela 6.20 – Lista de espécies identificadas exclusivamente pelo do uso da espectroscopia de massa

Tempo de retenção (minutos)	Espécie
18,48	2,4-bis(1,1-dimethylethyl) Phenol
18,52	Butylated hydroxytoluene
21,02	Sulfotep
21,27	2,4-di-t-butyl-6-nitrophenol
23,65	Dibutyl phthalate
25,82	4,4' - Dichlorobenzophenone
28,05	p,p' - DDE
30,68	Chlorobenzilate
32,80	4-chloro-alpha-(4-chlorophenyl)-alpha(trichloroethyl)-benzenemethanol

Tabela 6.21 – Lista completa de espécies identificadas pelo método

Tempo de retenção (minutos)	Espécie
18,48	2,4-bis(1,1-dimethylethyl) Phenol
18,52	Butylated hydroxytoluene
21,02	Sulfotep
21,27	2,4-di-t-butyl-6-nitrophenol
21,86	Alpha Lindane
23,50	Delta Lindane
23,65	Dibutyl phthalate
24,15	Vinclozolin
25,17	Dichlofluanid
25,26	Chlorpyrifos
25,73	Aldrin-R
25,82	4,4' - Dichlorobenzophenone
26,49	Isodrin
26,69	Procymidone
27,02	Folpet
27,42	Iprodione
27,75	Endosulfan
28,05	p,p' - DDE
28,49	Dieldrin
29,19	Endrin
29,27	Mitotane
29,40	Endosulfan II
30,35	o,p'-DDT
30,45	Endosulfan Sulfate
30,68	Chlorobenzilate
31,64	Myclobutanil
31,88	Methoxychlor
32,07	Endrin ketone
32,20	Dicofol
32,80	4-chloro-alpha-(4-chlorophenyl)-alpha(trichloroethyl)-benzenemethanol
32,92	Phosalone
34,21	Fenarimol

Com estas informações, conclui-se o capítulo do desenvolvimento do método e sua caracterização.

Seguidamente será descrito todo o trabalho de planeamento da execução do trabalho de campo e os testes efectuados para aquilatar a validade do planeamento realizado.

Capítulo 7 – Avaliação inicial dos pesticidas em uvas

Índice

CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO INICIAL DOS PESTICIDAS EM UVAS 201

7.1 INTRODUÇÃO 203
7.2 A ESCOLHA DOS GRUPOS DE APLICAÇÃO DOS PESTICIDAS 203
7.3 AVALIAÇÃO SOBRE A ESCOLHA DOS PARES DE PESTICIDAS ENTRETANTO EFECTUADA 207
7.4 REORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE PESTICIDAS 212

7.1 Introdução

O sétimo capítulo é dedicado à explicação da organização do trabalho relativo à aplicação de pesticidas, dos testes para a avaliação da validade da aplicação dos pesticidas aos pares e da avaliação dos pesticidas presentes nas uvas. É feita também uma comparação da degradação dos pesticidas em condições normais de maturação no meio ambiente e quando conservados a baixa temperatura.

7.2 A Escolha dos Grupos de Aplicação dos Pesticidas

De acordo com os interesses manifestados pela empresa vinícola decidiu-se realizar um projecto para implementar um método para a determinação de pesticidas em vinho. Apesar de ser necessário ter controlo sobre os pesticidas que podem ser encontrados nos vinhos, não é comum executar esse tipo de análise já que os custos do equipamento são elevados, a que se acrescentam os custos de utilização e manutenção. A alternativa utilizada pela generalidade das companhias consiste em enviar as amostras de vinho para analisar em laboratórios exteriores. Em Portugal existem poucos laboratórios que realizem a análise e os custos são mais elevados que os praticados pelos seus congéneres estrangeiros.

Após algumas trocas de impressões com o responsável vitícola decidiu-se que o trabalho de campo seria feito na Quinta de Azevedo por estar situada na região dos Vinhos Verdes, adequada para o estudo da maior parte dos pesticidas pretendidos. Além disso, era relativamente próxima, permitindo deslocações rápidas e frequentes, e podia-se contar com mão-de-obra capaz de executar os trabalhos. Foi então formulada uma lista de pesticidas organizada de forma a ter dois pesticidas para cada função: míldio, oídio, podridão cinzenta e insectos, que deveriam ainda constar na listagem da Protecção Integrada, já que a Quinta de Azevedo adopta esse regime agrícola. Para garantir que as quantidades encontradas fossem apenas provenientes

das aplicações devidas ao trabalho, foi decidido que a lista não incluísse pesticidas aplicados nos 5 anos anteriores. Decidiu-se também que as aplicações dos produtos fitossanitários se mantinham como estava planeado, fazendo-se as aplicações extra com os produtos a estudar antes da vindima.

Alguns dos pesticidas que integraram o conjunto a estudar não surgiram na pesquisa bibliográfica realizada, pelo que não havia garantias de que pudessem ser extraídos por SPME. O projecto resultante seria mais interessante mas também mais arriscado.

Para garantir que ainda existiam pesticidas aquando da recolha das amostras e fases iniciais da vinificação decidiu-se que estes seriam aplicados no dia anterior à vindima. Uma questão final que seria importante resolver era como organizar os pesticidas e as suas aplicações. Não seria de todo viável aplicar cada pesticida individualmente porque resultaria em 9 microvinificações (incluindo um ensaio de controlo) e em demasiadas amostras para analisar. Como também não interessava aplicar pesticidas em conjuntos muito grandes, porque aumentaria as hipóteses de interacção química dos produtos e também o perigo de toxicidade para as uvas, chegou-se à solução razoável de aplicar pares de pesticidas. Assim seriam realizadas 4 aplicações e 5 microvinificações. No entanto, mesmo após a escolha dos grupos de pesticidas, seria necessário garantir que o comportamento destes não era alterado pelo facto de ser aplicado conjuntamente com outro, pelo que se optou aplicar cada pesticida isoladamente, para depois poder comparar o decaimento de cada pesticida quando em grupo e isoladamente. Explica-se agora a divisão do conjunto de pesticidas efectuada.

Após ter sido decidido que os pesticidas seriam aplicados aos pares, foi necessário criar um conjunto de regras para a sua distribuição nos grupos. Assim, e por ordem de importância, definiram-se 3 regras para evitar a existência de interacções químicas e uma situação de competição pela penetração na película do bago para o interior da polpa, o que levaria inevitavelmente a uma diferença de comportamento relativamente ao comportamento do pesticida quando isolado. As regras estabelecidas são as seguintes:

(1) - Não juntar pesticidas com a mesma função;

(2) - Não juntar pesticidas da mesma família química;

(3) - Não juntar pesticidas que sejam sistémicos.

A lista dos pesticidas, suas funções e famílias químicas é a seguinte:

Pesticida	Função	Família
Diclofluanida	Fungicida (Míldio)	N-Tiotrihalometilo
Dicofol	Insecticida (Ácaros)	Organoclorado
Fenarimol	Fungicida (Oídio)	Pirimidina (Sistémico)
Imidaclopride	Insecticida	Cloronicotilo (Sistémico)
Mancozebe	Fungicida (Míldio)	Ditiocarbamato/Alquilenobis
Myclobutanil	Fungicida (Oídio)	Ditiocarbamato/Azola (Sistémico)
Procimidona	Fungicida (Podridão)	Dicarboximida
Vinclozolina	Fungicida (Podridão)	Dicarboximida

Com o objectivo de minimizar a contaminação entre bardos adjacentes, decidiu-se fazer aplicações apenas em bardos alternados, deixando eles um bardo sem qualquer aplicação.

Foram realizadas aplicações dos pesticidas individualmente e em pares para ser possível validar a utilização dos pares de pesticidas estabelecidos. Assim, a validação foi feita comparando os sinais obtidos para cada pesticida individualmente e quando num par através do teste de *t* de Student [53].

O mapa das aplicações encontra-se na figura 7.1. Os grupos formados respeitam as regras impostas *a priori*. O bardo de Controlo serve para identificar a possível presença de outros pesticidas aplicados anteriormente.

As aplicações de pesticidas foram realizadas pelo pessoal da Quinta de Azevedo, utilizando um aplicador Maruyama MS 068, com capacidade para cerca de 30 litros. A quantidade de uvas necessárias para se proceder a uma microvinificação era próxima dos 30 quilogramas. Apesar de cada pé produzir cerca de 2 a 3 quilogramas de uvas, decidiu-se aplicar pesticidas em 30 pés, de forma a garantir que existiria uva em quantidade suficiente para realizar a microvinificação. A aplicação realizada tentou reproduzir tanto quanto possível a aplicação que seria efectuada na véspera da vindima.

Realizou-se um teste preliminar para determinar o volume de solução necessária para pulverizar a totalidade dos pés de videira e determinou-se que seriam necessários cerca de 30 litros, capacidade aproximada do aplicador disponível.

Bardos	Pesticidas Aplicados
01	RUBIGAN (Fenarimol)
02	==========
03	RUBIGAN + MANCOZAN
04	==========
05	MANCOZAN (Mancozebe)
06	==========
07	RONILAN (Vinclozolina)
08	==========
09	RONILAN + CONFIDOR
10	==========
11	CONFIDOR (Imidacloprida)
12	==========
13	CONTROLO / TESTEMUNHA
14	==========
15	EUPARENE (Diclofluanida)
16	==========
17	EUPARENE + SYSTHANE S
18	==========
19	SYSTHANE S (Miclobutanil)
20	==========
21	DRIZA (Procimidona)
22	==========
23	DRIZA + KELTHANE
24	==========
25	KELTHANE (Dicofol)
26	==========

Figura 7.1 – Mapa da primeira aplicação de pesticidas

7.3 Avaliação sobre a escolha dos pares de pesticidas entretanto efectuada

Numa primeira fase, anterior ao trabalho de microvinificação, pretendeu-se avaliar se a introdução dos pares de pesticidas em vez dos pesticidas individualizados produz algum efeito em termos de alteração do seu decaímento. Os pesticidas foram então aplicados, a partir das soluções preparadas de cada um, sendo feitas as proporções para 30 litros das quantidades aconselhadas em cada embalagem de produto. Ao respeitar as quantidades indicadas nas embalagens do produto reproduziu-se as condições a que a vinha é sujeita até à fase da colheita dos cachos de uvas.

O tempo encontrava-se incerto, o que poderia afectar o ensaio, já que as aplicações têm de ser feitas com tempo seco e com a videira também seca. Além disso, durante as 4 horas seguintes não deve chover; após esse período, o pesticida já se encontra em acção e qualquer precipitação que ocorra apenas diminuirá o período de acção do produto. Decidiu-se então que as amostras fossem recolhidas no dia seguinte. As 24 horas que se esperou para a recolha das amostras seriam suficientes para que os pesticidas actuassem na planta.

Durante esse período não ocorreu precipitação mas o tempo não esteve seco. Talvez a humidade que se fez sentir durante toda a noite possa ter afectado a acção dos pesticidas. As amostras foram recolhidas, cortando os cachos de uvas de dimensão apreciável (com cerca de 300 gramas de uvas), que foram guardados em sacos de plástico com fecho hermético. Foram depois acondicionados numa arca frigorífica com termoacumuladores para as manter frias durante o transporte até ao Porto. Depois ficaram guardadas, ainda dentro dos sacos plásticos, num frigorífico a uma temperatura de cerca de 4º C.

O procedimento utilizado para analisar as uvas consistia em esmagar e triturar com a ajuda de uma "varinha mágica" Krups até ficarem uma massa tão homogénea quanto o possível. Não foi possível homogeneizar totalmente as uvas, principalmente por causa das graínhas e das películas. Quando a massa dos bagos de uva estivesse satisfatoriamente homogénea, guardo-a num frasco de centrífuga. Assim que os frascos de vidro de amostra já continham a quantidade de cloreto de sódio e o volume de água pretendidos, adicionava-se

a quantidade de massa de bagos de uva em causa. Como era difícil determinar o volume da massa de uva esmagada, optou-se por utilizar 5,00 gramas e não o volume total. Essa massa de uva foi usada para todos os ensaios com esse tipo de amostra. Em todos os casos, as uvas foram esmagadas no próprio dia em que foram analisadas. Tal procedimento foi usado para garantir que não ocorreria qualquer outro tipo de degradação, tanto dos pesticidas como das amostras.

O principal objectivo do estudo desta secção era avaliar se havia ou não diferenças significativas entre a quantidade de pesticida que permanece na uva quando a sua aplicação é feita individualmente ou em grupo, de acordo com os grupos formados. As análises efectuadas visavam então a comparação de quantidades de pesticidas presentes nas uvas e, para esse efeito, foi utilizado o teste *t* de Student. Como o desvio-padrão do método era significativo, foi assumido que o desvio-padrão da avaliação é fundamentalmente o do método. O desvio-padrão do método foi avaliado a partir da repetição dos ensaios com a Testemunha, na presença de pesticidas. Em todo o processo supôs-se que a distribuição dos resultados era normal, condição necessária para que se pudesse aplicar este tipo de teste.

Assim, foram realizadas análises nessas amostras e os valores encontrados foram depois comparados, utilizando o teste de *t* de Student, expresso pela equação 7.1.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2\left(\left[1/n_1\right] + \left[1/n_2\right]\right)}}$$

Equação 7.1 – Teste *t* de Student para a comparação de duas amostras

Na equação 7.1, s é o desvio-padrão, x é a média da amostra e n o número de repetições efectuadas. O valor de *t* encontrado foi depois comparado com um valor de *t* crítico, para n_1+n_2-2 graus de liberdade. Foram utilizados dois ensaios para cada média calculada, pelo que o número de graus de liberdade é 2. Os desvios-padrão relativos encontrados para o método são geralmente superiores a 10%, pelo que é razoável usar o desvio-padrão associado ao método como estimativa do desvio padrão dos ensaios.

Como as amostras eram semelhantes, foram comparadas as áreas dos picos de cada pesticida e não a respectiva concentração.

Tabela 7.1 – Comparação dos resultados para os pares e pesticidas aplicados de forma individual

Amostra	Áreas encontradas	Desvio-padrão	$t_{crítico}$	$t_{calculado}$
Dicofol	1.771	$4x10^6$	4,30	0,000
Dicofol	2.287	-	-	-
Procimidona	787.456	-	-	-
Procimidona	292.851	$4x10^5$	4,30	1,246
Diclofluanida	113.229	$3x10^5$	4,30	0,126
Diclofluanida	73.069	-	-	-
Miclobutanil	-	-	-	-
Miclobutanil	-	-	-	-
Vinclozolina	3.695.044	$8x10^5$	4,30	1,440
Vinclozolina	2.492.583	-	-	-
Imidacloprida	-	-	-	-
Imidacloprida	-	-	-	-

Relativamente aos resultados obtidos, que se encontram na Tabela 7.1, verifica-se que quatro dos pesticidas não foram identificados. No caso do Imidaclopride e do Mancozebe, a sua identificação e determinação não foi sido possível em solução aquosa e isoladamente porque não surgiam sinais compatíveis com a injecção de uma grande quantidade de um composto nos ensaios efectuados. Não foi possível obter os respectivos espectros de massas e por isso não foi possível identificar quais os picos relativos a cada um dos pesticidas, no caso de serem separados pela coluna e surgirem no cromatograma, mas que nunca chegou a acontecer. Coloca-se, por outro lado, a questão de estes pesticidas serem ou não eficientemente extraídos da solução. Caso isto não tenha acontecido, é então natural que nenhum sinal aparecesse no cromatograma. Outra hipótese que pode explicar o sucedido é de os pesticidas não terem sido separados na coluna, isto é, foram extraídos da solução, injectados para o interior da coluna mas a sua afinidade com esta e o programa de temperaturas não permite a sua separação e daí eles não alcançarem o detector. Qualquer uma destas hipóteses é possível para explicar

o facto de não ter sido possível identificar o Imidaclopride e o Mancozebe. No entanto, no caso do Mancozebe deve-se juntar um dado adicional, a sua temperatura de decomposição. Segundo dados recolhidos [15], o Mancozebe decompõe-se antes de se fundir, e tal acontece a temperatura baixa, quando comparado com as atingidas no programa de cromatografia. Ora, o que pode acontecer é que este pesticida se decomponha antes de alcançar o detector, sendo portanto impossível identificá-lo. No entanto também não foi possível detectar qualquer dos produtos de degradação conhecidos do Mancozebe. O que pode reforçar a teoria do pesticida não ter sido sequer extraído da solução. Em jeito de conclusão, e face à análise dos problemas surgidos, optou-se por retirar estes dois pesticidas do estudo.

O Miclobutanil foi identificado em solução aquosa durante a fase de melhoramento do método, utilizando a formulação do pesticida disponível comercialmente (Systhane S). A sua identificação foi sempre algo problemática, sendo apenas possível quando isolado. Por outro lado, não foi possível adquirir, em tempo útil, um padrão para fazer a quantificação pela adição de padrão. Assim, foi decidido retirar este pesticida do estudo porque não existiam perspectivas de que fornecesse resultados válidos.

O caso do Fenarimol é diferente, já que este pesticida foi identificado em solução e na presença de outros pesticidas aquando dos ensaios laboratoriais. Apesar da sua extracção e identificação ser, por vezes, difícil, o Fenarimol era identificado em solução aquosa. Para além do possível efeito de matriz, uma explicação plausível para o facto de não aparecer nas amostras de uvas é ter tido um desaparecimento rápido. Vem referido na literatura que o seu tempo de semi-vida é cerca de 12 horas [15], o que vem apoiar a ideia de uma degradação rápida, a que se pode juntar algum efeito de matriz. Estes dois factores em conjunto podem tornar bastante difícil a quantificação deste pesticida nas uvas e no vinho. No entanto, é difícil de compreender como é que um pesticida pode desaparecer da planta em 24 horas, colocando-se a questão sobre a sua acção contra as pragas com um tempo de residência tão curto. De qualquer forma, a quantidade de produto aplicada pode ter sido pequena e, passadas essas 24 horas, a quantidade restante ser inferior ao limite de detecção do método, justificando assim os resultados obtidos.

Atendendo à comparação dos valores de *t* encontrados com os de *t* crítico, para um grau de confiança de 95% e 2 graus de liberdade, verifica-se que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos para as aplicações dos pares e as individuais, para os pesticidas em que essa determinação foi possível. Desta forma, pode-se concluir que a aplicação simultânea dos pesticidas não introduz, nos pares testados, um factor significativo de variação adicional na experiência, pelo que é válida a utilização dos pares.

No entanto, é preciso realçar que os desvios-padrão são muito elevados pelo que não será difícil chegar à conclusão que não há, estatisticamente, diferenças entre as duas médias comparadas. A explicação para esse facto é a escolha que foi feita para a concentração dos pesticidas para os ensaios de repetibilidade e o estado do desenvolvimento do método. Assim, não era possível saber qual o nível de concentração de cada pesticida que iria surgir nas amostras de uvas recolhidas. Optou-se por usar uma concentração de 800 ppb nos ensaios de repetibilidade, para cada pesticida. Os resultados obtidos mostram que não foi uma escolha acertada. Por outro lado, o método ainda não estava totalmente desenvolvido e por isso foi feita uma referência a esse problema no capítulo anterior. Quando foi necessário realizar estes ensaios, o método não estava completamente desenvolvido e por isso foi utilizado o método conforme estava nessa altura. As análises tinham de ser feitas naquela altura e não havia outra hipótese. Assim, provavelmente os resultados foram afectados por esse motivo, não existindo grande confiança neles. No entanto, é preferível ter alguns resultados do que tomar decisões sem qualquer base ou fundamento científico. Por esse motivo apresentam-se estes resultados.

Dos resultados obtidos conclui-se que, para os pesticidas em que a detecção foi possível, não foram encontradas diferenças significativas da degradação dos pesticidas nas uvas quando aplicados em pares ou individualmente, o que significa portanto que é válida a sua aplicação nos pares estabelecidos. Como não havia perspectiva de obter resultados válidos em futuros ensaios, pelas razões já referidas, foram eliminados do estudo os pesticidas Imidaclopride, Mancozebe e Miclobutanil.

7.4 Reorganização dos grupos de pesticidas

A lista dos pesticidas em estudo ficava então reduzida a 5 e era também necessário reorganizar os pares de pesticidas a aplicar pois não seria útil e racional efectuar quatro aplicações de pesticidas e realizar cinco microvinificações para um conjunto de 5 pesticidas. Assim, reordenou-se os pesticidas em 3 grupos, respeitando tanto quanto possível as regras anteriormente estabelecidas. Os grupos relativos aos bardos 17 e 23 estavam já definidos e por isso mantiveram-se inalterados. Relativamente ao grupo Vinclozolina + Fenarimol, que foi criado após a análise dos resultados da primeira aplicação de pesticidas, foi necessário escolher qual o bardo em que seria aplicado este par. Existiam as hipóteses dos bardos 03 e 09, mas a decisão teve em conta os produtos que foram aplicados anteriormente em cada um desses bardos. No bardo 03 foram anteriormente aplicados o Fenarimol e Mancozebe, enquanto no bardo 09 tinha sido o par Vinclozolina e Imidaclopride. Decidiu-se fazer a aplicação no bardo 03 já que nenhum dos pesticidas aplicados nesse bardo foi detectado. Assim, as amostras retiradas do bardo 03 não apresentam qualquer sinal de pesticidas, o que se traduz num ensaio em branco, até outros pesticidas serem lá aplicados. Já o bardo 09, em que foi possível detectar o Vinclozolina aplicado inicialmente, como se poderá verificar na Tabela 7.2, o mesmo não aconteceria, pois correr-se-ia o risco de ainda existir nas uvas Vinclozolina da primeira aplicação.

Em relação aos outros dois pares, as aplicações foram realizadas nos mesmos bardos.

Será iniciada nesta altura a segunda parte do estudo, que inclui a segunda aplicação de pesticidas, a vindima e a vinificação das uvas. Depois de estabelecido o novo mapa das aplicações (Figura 7.2), foi calendarizada a aplicação e a vindima de forma a executar a vindima e o transporte das uvas no mesmo dia e bem cedo, para se iniciar de imediato a execução das microvinificações.

Decidiu-se fazer a vindima no dia a seguir à aplicação, como já tinha sido feito na primeira aplicação de pesticidas, de forma a ter a maior quantidade possível de pesticida nos cachos, principalmente por causa do Fenarimol.

Foram recolhidas amostras de uvas no dia da segunda aplicação dos pesticidas, ainda antes de esta ser realizada, para verificar quais as quantidades de pesticidas presentes cada bardo. Foram então determinadas as quantidades de pesticida presentes nas uvas de cada bardo, antes da segunda aplicação (Tabela 7.2). O procedimento seguido foi o mesmo indicado para as primeiras determinações. A Tabela 7.2 compara as áreas dos sinais para os vários pesticidas de amostras de uvas, resultantes da primeira aplicação de pesticidas, em que uma delas foi conservada fechada a baixa temperatura (num frigorífico) e a outra permaneceu na videira. Assim, o tempo que decorreu desde a aplicação dos produtos até à análise das amostras foi semelhante, sendo que apenas a conservação destas foi distinta.

Bardos	Pesticidas Aplicados
01	
02	==========
03	VINCLOZOLINA + FENARIMOL
04	==========
05	
06	==========
07	
08	==========
09	
10	==========
11	
12	==========
13	CONTROLO / TESTEMUNHA
14	==========
15	
16	==========
17	DICLOFLUANIDA
18	==========
19	
20	==========
21	
22	==========
23	PROCIMIDONA + DICOFOL
24	==========
25	
26	==========

Figura 7.2 – Mapa da segunda aplicação dos pesticidas

Tabela 7.2 – Comparação entre a degradação dos pesticidas na videira e a baixa temperatura

	Áreas dos sinais obtidos	
Pesticida	No frio	Na Videira
Vinclozolina	2.492.583	-
Diclofluanida	73.069	3.261
Procimidona	292.851	131.628
Dicofol	2.287	-
Fenarimol	-	-

A partir dos resultados da Tabela 7.2, verifica-se que os sinais relativos aos pesticidas presentes eram muito pequenos, o que, pelas experiências realizadas, faz prever que corresponda a concentrações muito baixas.

Deve-se fazer uma chamada de atenção ao resultado do Vinclozolina. Não se detectou Vinclozolina nas uvas do bardo 03 (bardo em que se iria realizar a 2ª aplicação deste pesticida) porque este não tinha sido aplicado nesse local. Assim, não se pode estranhar que o resultado obtido seja nulo. No entanto, optou-se por incluir o seu resultado porque mostra que a área que se obtém é bastante mais elevada do que os restantes pesticidas, quando a amostra é conservada no frio.

Quanto aos restantes pesticidas, não se encontrou sinais relativos ao Dicofol e ao Fenarimol, sendo no entanto detectada a presença do Diclofluanida e Procimidona. No caso do Diclofluanida, a quantidade presente deverá ser bastante pequena porque o sinal obtido tem uma altura reduzida, o que não invalida a identificação a partir do programa de espectroscopia de massa. Este sinal é manifestamente pequeno quando comparado com o sinal obtido para 20 ppb do pesticida, em que se obtém um sinal com uma altura cerca de 150 vezes mais elevada. Relativamente ao Procimidona, a situação é semelhante excepto no facto de o sinal obtido ser um pouco maior.

Comparando os resultados obtidos para a degradação no campo e a baixa temperatura, verificou-se que, como seria de esperar, a degradação dos pesticidas a baixas temperaturas é muito menos extensa do que no campo.

Como foi possível demonstrar, a aplicação dos pesticidas aos pares não introduz um factor de variabilidade adicional dos resultados. Desta forma, é

válido continuar com o plano de execução criado e partir para a fase da microvinificação e recolhas de amostras.

Capítulo 8 – Os pesticidas durante a produção de um vinho

Índice

CAPÍTULO 8 – OS PESTICIDAS DURANTE A PRODUÇÃO DE UM VINHO 217

8.1 INTRODUÇÃO 219
8.2 O PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO 219
8.2.1 Descrição do procedimento de vinificação 219
8.2.2 – Recolha das amostras 225
8.3 RESULTADOS OBTIDOS 227
8.3.1 Determinação das concentrações 228
8.3.2 Fenarimol e Dicofol 230
8.3.3 Diclofluanida 230
8.3.4 Procimidona 235
8.3.5 Vinclozolina 239
8.3.5 Avaliação conjunta dos resultados 243

8.1 Introdução

Neste capítulo descreve-se pormenorizadamente todo o processo de microvinificação utilizado, explica-se as fases em que se recolheram amostras e avalia-se o comportamento dos pesticidas durante a produção do vinho, de acordo com os resultados obtidos. É feita uma avaliação de cada pesticida individualmente e também uma avaliação conjunta, encontrando pontos coincidentes entre eles.

8.2 O processo de microvinificação

Nesta secção vai ser descrito todo o processo de microvinificação que foi executado assim como as diversas fases em que se recolheram amostras para analisar.

8.2.1 Descrição do procedimento de vinificação

Após o estudo do comportamento dos pesticidas nas uvas, chega agora a parte em que se estuda o comportamento dos pesticidas durante a vinificação. Como já foi referido, o processo de microvinificação implementado já é normalmente utilizado pela empresa. Consiste, de uma forma resumida, nos seguintes passos:

- Esmagamento
- Prensagem
- Sulfitagem
- Decantação estática no frio
- Trasfega
- Inoculação de levedura
- Fermentação alcoólica a temperatura controlada
- Trasfega
- Tratamento pelo frio

- Ajuste do sulfito
- Engarrafamento

Explica-se de seguida os processos pormenorizadamente e também os passos em que as amostras foram recolhidas.

Pelo início da manhã, as uvas foram colhidas na Quinta de Azevedo e carregadas para caixas próprias para o seu transporte. Foram colhidas em quantidade suficiente para encher 2 caixas por cada lote (os lotes serão daqui para a frente referidos pelos números do bardo onde foram aplicados os pesticidas). Foram depois transportadas para Avintes no mais breve período de tempo, onde cada lote foi imediatamente submetido às etapas iniciais do processo de microvinificação.

O primeiro passo foi pesar cada lote de uvas para saber mais ou menos que quantidade de massa vínica seria produzida (Figura 8.1). Os valores obtidos foram os seguintes:

Lote	Massa de uvas / kg
03	32.9
13	32.9
17	36.4
23	34.4

As uvas foram introduzidas num pequeno esmagador (Figura 8.2), que promoveu o seu esmagamento. Seguidamente passaram para o interior de uma prensa (Figuras 8.3 e 8.4) e inicia-se a fase da prensagem, aplicando uma pressão de 400 bar, e efectuando 3 apertos. Entre apertos é efectuada a homogeneização das massas para que a prensagem seja mais eficiente.

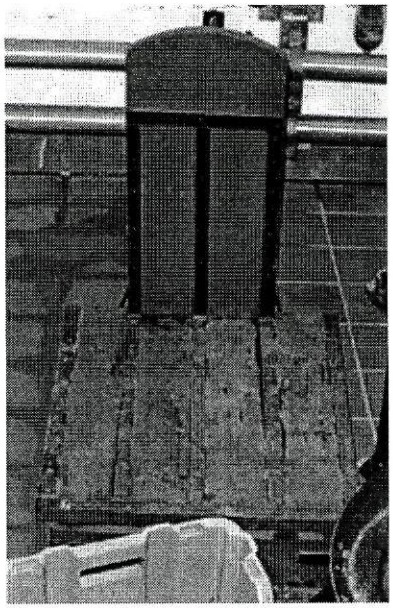


Figura 8.1 – Balança utilizada para a pesagem das caixas

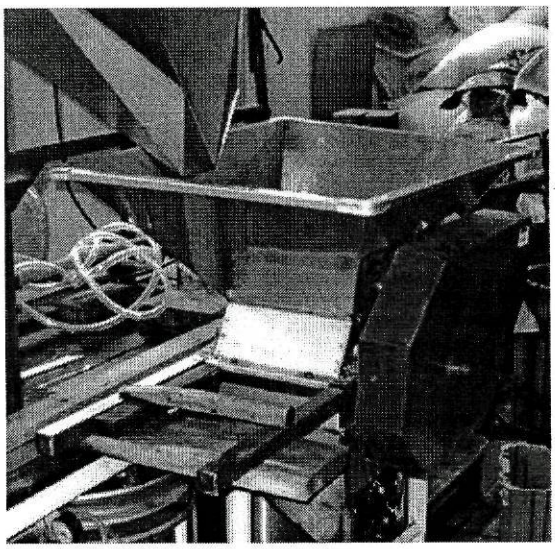


Figura 8.2 – Esmagador utilizado para a microvinificação

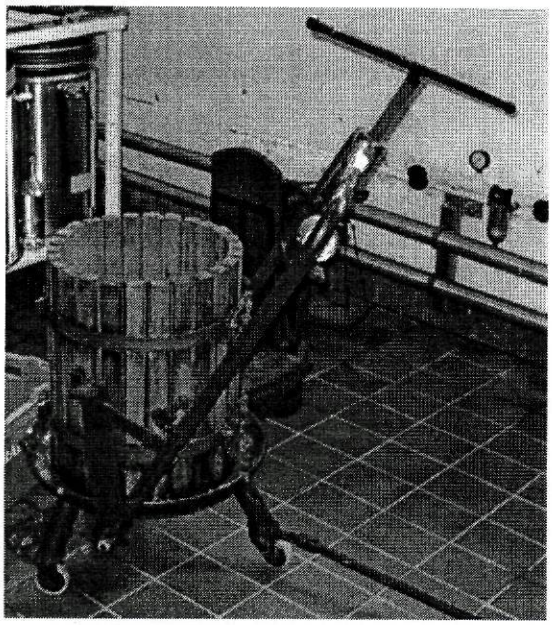


Figura 8.3 – Prensa utilizada para a microvinificação

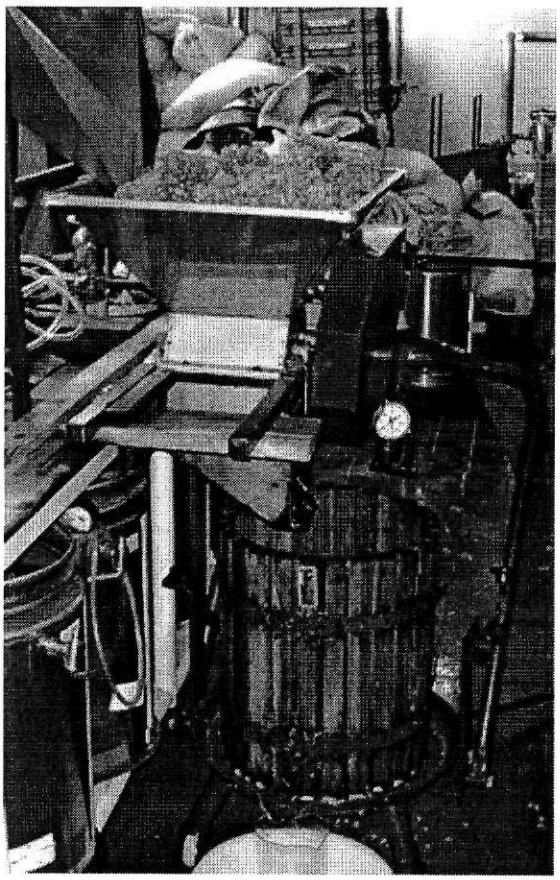


Figura 8.4 – Esmagamento das uvas e passagem para a prensa

Todos os líquidos libertados foram sendo recolhidos para um vasilhame com capacidade para cerca de 20 litros (Figura 8.5).

Depois de recolhidos os mostos para os vasilhames, foi efectuada a operação de sulfitagem (adição de uma solução de sulfito de sódio com o intuito de prevenir oxidações do mosto e atrasar o início da fermentação alocoólica), acertando a concentração de sulfito para 60 miligramas por litro.

A etapa seguinte da microvinificação foi a decantação dos mostos, com um período de repouso de 24 horas a uma temperatura de 0 °C, feita numa das câmaras frigoríficas da empresa, na ausência de luz.

Após a decantação, retiraram-se os vasilhames das câmaras frigoríficas e realizou-se a trasfega de todos os lotes para vasilhames mais pequenos. A trasfega foi realizada com a ajuda de uma mangueira e os mostos foram transferidos para garrafões de vinho com capacidades de 10 e 5 litros. Toda a matéria que assentou durante a fase de decantação e ficou depositada no fundo dos vasilhames foi rejeitada, não sendo aproveitada para qualquer etapa posterior do processo de vinificação.

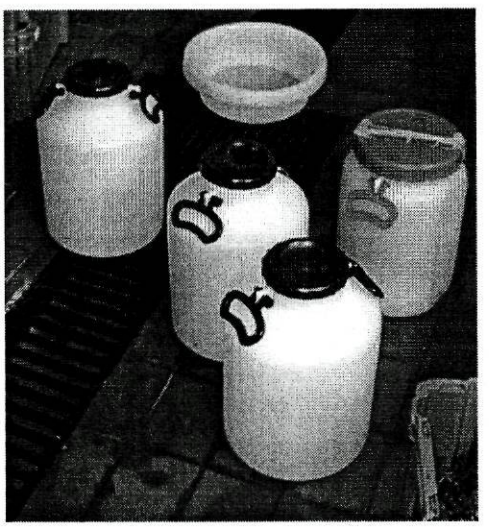


Figura 8.5 – Vasilhames utilizados para conservação dos mostos

Assim que a trasfega de todos os lotes ficou completa, procedeu-se à inoculação com levedura QA 23, com uma concentração de 400 miligramas por litro. Todos os garrafões foram inoculados de forma a ficarem com a mesma concentração. Após a adição das leveduras, os garrafões foram tapados com

rolhas perfuradas, para que o oxigénio possa passar para o interior do garrafão para permitir a respiração das leveduras. Os garrafões foram depois conservados num tanque com água suficiente para os cobrir pela altura a que se encontravam os mostos proporcionando uma temperatura baixa, que permite a actividade das leveduras (Figuras 8.6 e 8.7). Consegue-se assim levar a cabo uma Fermentação alcoólica a temperatura controlada.

A fermentação foi seguida a partir da quantificação dos açúcares ainda presentes nos mostos. A fermentação do lote de Controlo iniciou-se mais tarde que as restantes, mas terminaram todas sensivelmente ao mesmo tempo.



Figura 8.6 – Conservação dos garrafões durante a fermentação alcoólica

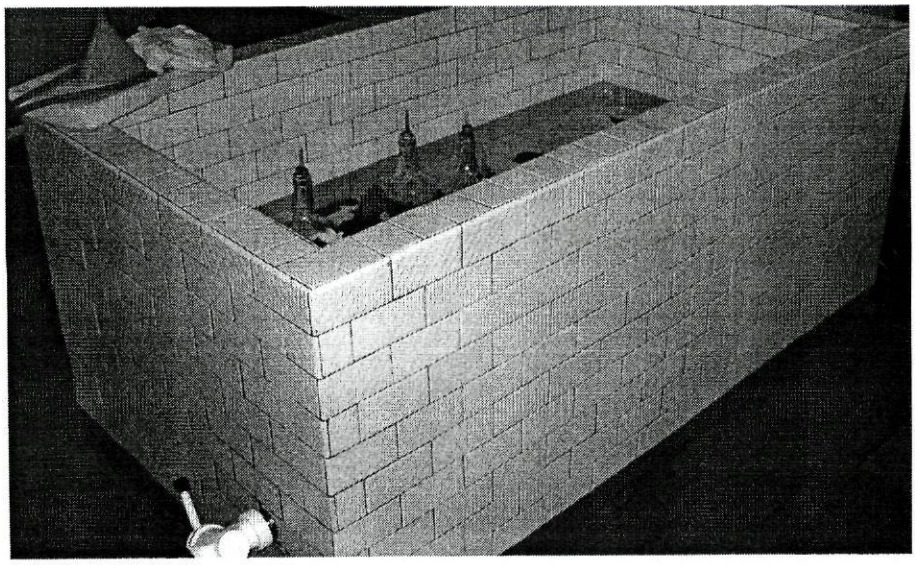


Figura 8.7 – Tanque onde se conservaram os garrafões

Depois de se ter verificado que todas as fermentações tinham efectivamente terminado, efectuou-se nova trasfega, desta vez para garrafas. Nesta altura efectuou-se nova sulfitagem, adicionando solução suficiente para obter uma concentração de sulfito de 5 miligramas por litro. As garrafas foram arrumadas em caixas agrupadas em função do lote a que pertenciam.

O passo seguinte da microvinificação foi o tratamento pelo frio durante 7 dias, isto é, numa câmara frigorífica na ausência de luz. Esse tratamento, como foi referido no capítulo 1, tem como propósito a precipitação dos sais tartáricos, fenómeno que é indesejável que aconteça posteriormente.

Assim que terminou o tratamento pelo frio, efectuou-se nova trasfega, de garrafa para outra garrafa, e ajustou-se o sulfito a 50 miligramas por litro. As garrafas foram depois todas arrolhadas e terminou a microvinificação.

8.2.2 – Recolha das amostras

A planificação das recolhas de amostras deve ser feita para que as amostras recolhidas possam recriar os vários passos efectuados durante o processo de vinificação. Assim, tentou-se reproduzir todos os passos considerados significativos da vinificação, principalmente todos os que envolviam uma transformação física da amostra.

Relativamente ao início da vinificação, optou-se por recolher amostras do mosto após a sulfitagem. A quantidade de sulfito presente afecta significativamente a altura dos picos e por isso é importante para a execução do processo de extracção por SPME, pelo que a recolha de amostras foi realizada após essa operação.

De seguida foram recolhidas amostras do mosto trasfegado, após a decantação a 0º C. Durante a decantação, vários tipos de impurezas depositam-se, assim como ocorre o primeiro contacto do sumo da uva com o ar e por isso os primeiros fenómenos oxidativos.

Posteriormente decorreu a fermentação alcoólica a temperatura controlada. Este passo decorreu durante 12 dias e decidiu-se seguir a degradação dos pesticidas em vários pontos da fermentação, tão equidistantes quanto possível. A fermentação alcoólica deveria ser o passo mais importante para a degradação dos pesticidas, já que é nesse período que decorrem as maiores transformações no mosto, passando de um líquido açucarado a um alcoólico, alterando de forma radical a sua composição. Assim, recolheram-se amostras nos 3º, 5º, 7º e 10º dias após a inoculação do mosto. A fermentação alcoólica foi seguida em 6 pontos distintos: o seu início, com a amostra recolhida na trasfega após a decantação, o decorrer da fermentação, desde o 3º ao 10º dia após a inoculação do mosto, e o seu final, com a amostra recolhida na trasfega após a fermentação.

Depois de terminada a fermentação alcoólica, efectuou-se uma trasfega do vinho. Neste caso, é importante a recolha de amostras já que era o resultado final da fermentação, podendo apontar para o comportamento dos pesticidas durante toda a fermentação.

Posteriormente à trasfega, seguiu-se a fase do tratamento pelo frio. Como este passo decorre a baixas temperaturas, supôs-se que o decaimento dos pesticidas seja mais lento, pelo que se decidiu recolher apenas uma amostra a meio do processo (5º dia de frio). Assim, o tratamento pelo frio foi seguido através de 3 recolhas de amostras: trasfega após a fermentação alcoólica, o 5º dia de frio e o vinho já terminado.

Finalmente, para concluir o estudo durante o processo de vinificação, considerou-se importante recolher amostras na trasfega final, antes do engarrafamento propriamente dito. Neste ponto, dá-se o vinho como concluído,

sendo arrolhado, o que implica uma redução drástica do contacto com o ar, o que se pode traduzir numa alteração da velocidade de degradação dos pesticidas.

Como o vinho se encontra engarrafado e o contacto com o ar e o ambiente exterior está limitado, as fases de recolha de amostras posteriores ao engarrafamento foram mais espaçadas. Assim, optou-se por recolher amostras 7 dias após o engarrafamento, para que se pudesse seguir o comportamento nos primeiros dias de contacto com a garrafa e no contacto limitado com o ar, e depois só 1 mês após o engarrafamento, período de tempo considerado nem muito curto, que não demonstrasse qualquer evolução nas quantidades dos pesticidas, nem demasiado longo e que resultasse num desaparecimento do pesticida, sem que fosse possível verificar a sua degradação.

Assim, foram recolhidas amostras em 11 passos ao longo da produção do vinho. Foram recolhidas amostras das borras e outras massas que foram sendo rejeitadas ao longo da vinificação. A análise das massas rejeitadas ao longo do processo de vinificação poderiam fornecer mais alguns dados sobre o desaparecimento dos pesticidas, nomeadamente se os pesticidas tinham degradado ou se tinham sido eliminados com esses resíduos da vinificação. No entanto essas análises apresentaram um grande conjunto de dificuldades, não sendo possível obter resultados concordantes entre si nem resultados que se adequassem aos teores de pesticidas encontrado nas amostras de mosto recolhidas.

8.3 Resultados obtidos

Nesta secção apresentam-se os resultados obtidos para as análises das amostras recolhidas durante a vinificação. Os resultados serão apresentados e analisados para cada pesticida, separadamente, e depois tratados em conjunto, tentando retirar conclusões sobre as afinidades de comportamento.

8.3.1 Determinação das concentrações

O método utilizado para a determinação das concentrações dos pesticidas foi a adição de padrão [20,53]. Desta forma, é possível reduzir os efeitos de matriz que surgem na análise de amostras complexas, como é o caso de vinhos e alimentos, principalmente porque as matrizes que foram analisadas vão sendo sucessivamente diferentes, colocando problemas diferentes em cada amostra analisada.

Quando se analisa amostras relativamente simples, como as aquosas, o uso de uma curva de calibração do método e a determinação por interpolação é normalmente possível. Nestes casos, assume-se que não há efeitos de matriz presentes. Quando os analitos estão numa matriz complexa, o método de adição de padrão é o mais recomendado. Inicialmente, pode-se tentar utilizar uma variante do método de calibração, tentando preparar padrões com a mesma matriz das amostras mas sem estar presente o analito. Geralmente isto não é possível, pelo que as análises são sempre realizadas na presença da matriz. Uma alternativa é o método de adição de padrão. O procedimento habitual neste método consiste em realizar experiências em que são adicionadas pequenas quantidades conhecidas de analito e, depois de obtidos os resultados (Tabela 8.1), representar graficamente representando o sinal obtido em função da concentração de analito adicionada. Claro que no caso da amostra, o sinal obtido será representado para uma concentração igual a zero (Figura 8.8). O valor da concentração calculado é o valor do eixo dos xx's quando y é igual a zero.

Nos ensaios realizados, optou-se por repetir 2 vezes cada amostra, de forma a ter maior confiança no resultado obtido. Decidiu-se também realizar 2 adições de padrão para cada amostra para que o cálculo da concentração seja obtido com confiança suficiente mas sem ser preciso realizar demasiados ensaios.

Tabela 8.1 – Exemplo de resultados obtidos em ensaios de adição de padrão

Ensaios	1º ensaio	2º ensaio
Amostra	678.027	798.606
Adição de 10 ppb	777.812	794.382
Adição de 20 ppb	864.169	823.962

Médias (ppb)		
0	10	20
738316,5	786097	844065,5
Declive	**Ordenada**	**r**
5287,45	736618,5	0,998457

A Tabela 8.1 mostra os resultados obtidos para a análise das amostras no 3º dia de fermentação, para o lote que continha Procimidona e Dicofol. Na parte esquerda estão os resultados obtidos para cada ensaio realizado, e na metade direita estão os resultados obtidos para os valores médios calculados. Como se pode verificar, o coeficiente de correlação linear é bastante aceitável (r=0.998). O valor obtido para a concentração, por extrapolação a y igual a zero, é 279 ppb.

Este procedimento foi utilizado para todas as amostras analisadas. De seguida só se apresentam os resultados obtidos, sendo omitidos os cálculos efectuados a partir das áreas dos picos.

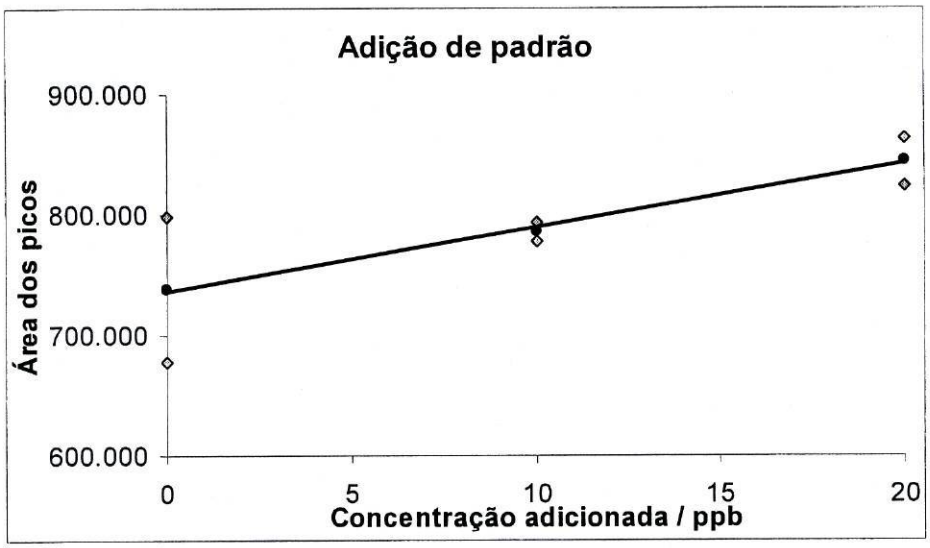


Figura 8.8 – Gráfico demonstrativo da adição de padrão

8.3.2 Fenarimol e Dicofol

Não foi possível encontrar qualquer sinal relativo ao Fenarimol ou ao Dicofol. A ausência do sinal do Fenarimol pode-se explicar pela existência de efeitos de matriz, conjugados com o facto do referido pesticida ter um tempo de semi-vida bastante pequeno. Apesar disso, a quantidade de Fenarimol foi determinada sendo efectuada em todas as amostras analisadas, sendo o seu resultado nulo em todas elas.

O Dicofol, apesar de ter sido encontrado nas uvas após a aplicação dos pesticidas, não foi encontrado nas amostras relativas ao processo de vinificação. As razões para este facto devem ser em tudo semelhantes às referidas para o Fenarimol, até porque são compostos bastante semelhantes.

8.3.3 Diclofluanida

O Diclofluanida foi analisado isoladamente já que também a sua aplicação foi feita individualmente. A Tabela 8.2 mostra os resultados obtidos para as análises durante a fase de produção do vinho. A Figura 8.9 mostra o gráfico da concentração de Diclofluanida ao longo dos dias em que decorreu a vinificação.

Tabela 8.2 – Variação do teor de Diclofluanida ao longo da produção do vinho

Fase do processo	Dias decorridos	Concentração (ppb)	% que resta	% que se perdeu	Velocidade (µg/l dia)
Sulfitagem	0	752	100,00	-	-
Trasfega	1	198	26,33	73,67	554
3º dia fermentação	4	184	24,47	7,07	5
5º dia fermentação	6	60	7,98	67,39	62
7º dia fermentação	8	7	0,93	88,33	27
10º dia fermentação	11	4	0,53	42,86	1
Trasfega após FA	13	-	-	-	-
5º dia de frio	18	-	-	-	-
Vinho	20	-	-	-	-
7º dia em garrafa	27	-	-	-	-
1 mês em garrafa	52	-	-	-	-

Como se pode observar, tanto pela Tabela 8.2 como pelo gráfico apresentado, a fase em que ocorre a maior degradação do pesticida é do primeiro para o segundo dia, período em que decorre a deposição das borras e posterior decantação. Nesse período, a quantidade de Diclofluanida diminui de 752 ppb para 198 ppb, isto é, uma diminuição para 26% do seu valor inicial.

Durante esse período, o lote, após ter sofrido as fases de esmagamento, prensagem e sulfitagem (onde se recolheu a amostra inicial), foi conservado durante 24 horas a cerca de 0 ºC e na ausência de luz. Ora, não seria previsível que existisse um decaímento tão extenso durante apenas 24 horas e a baixa temperatura. Este comportamento pode-se explicar pela maior concentração do pesticida nas massas que precipitaram e que foram depois rejeitadas. O pesticida deverá ter maior afinidade pelas massas do que pelo mosto e por isso foi eliminado. Outro aspecto que pode explicar este comportamento é a precipitação do pesticida a baixas temperaturas, sendo depois eliminado da amostra na trasfega. Finalmente, o facto de ser nesta altura que os componentes dos bagos de uva têm o primeiro impacto com o oxigénio e por isso passarem a estar sob a acção oxidante deste, pode ser uma razão para o seu desaparecimento.

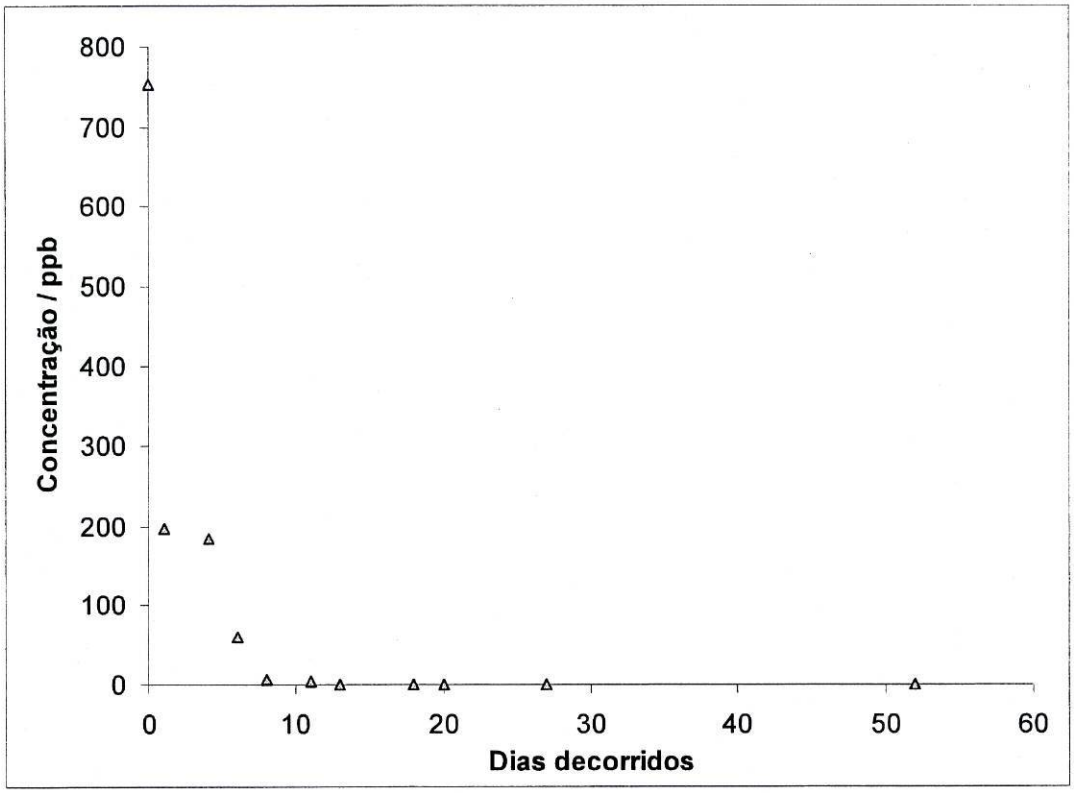


Figura 8.9 – Gráfico da variação do teor de Diclofluanida ao longo da produção do vinho

Após a trasfega, foi feita a inoculação com leveduras, iniciando-se a fermentação alcoólica. Nos primeiros 3 dias após a inoculação, a diminuição da concentração de Diclofluanida foi relativamente baixa (passando de 198 para 184 ppb), representando uma diminuição de 7%. No entanto, nos dias seguintes de fermentação, a degradação do pesticida foi bastante mais rápida. Essa diferença de comportamento nos primeiros dias de fermentação pode ser explicada por um arranque tardio ou até mais lento da actividade das leveduras, fazendo como que as alterações da composição química da solução fossem pouco significativas. Nos restantes dias de fermentação, a concentração de Diclofluanida passou de 184, para 60, depois 7 e finalmente 4 ppb, nos 3º, 5º, 7º e 10º dia de fermentação, respectivamente. Na tabela inclui-se também a velocidade de degradação dos pesticidas, definida segundo o descrito pela equação 8.1, em que C_x são as concentrações dos pesticidas e D_x o número de dias decorridos desde o início do trabalho de vinificação.

$$V = \frac{C_1 - C_2}{D_2 - D_1}$$

Equação 8.1 – Definição da velocidade de degradação

A partir deste cálculo, pretendeu-se encontrar uma forma de comparar a rapidez de decaimento dos pesticidas, para depois avaliar a influência dos vários passos da vinificação na degradação dos pesticidas. Em relação às velocidades de decaimento do Diclofluanida durante a fermentação alcoólica, constatou-se que inicialmente a velocidade era lenta, tendo um aumento até ao 5º dia, começando a baixar para as amostras seguintes. Este comportamento deve-se provavelmente a um arranque tardio da fermentação, daí a velocidade inicial ser relativamente baixa, e assim que as leveduras começam a fermentação e começam a aumentar o seu número (aumentando portanto a velocidade de fermentação), a velocidade de decaimento é também mais elevada. Como a fermentação se vai tornando mais lenta (por diminuição da actividade das leveduras e o desaparecimento dos açúcares no seio do mosto), também a degradação dos pesticidas abranda, até que se consome a totalidade do Diclofluanida.

Observando a Figura 8.9, verifica-se que o decaimento do Diclofluanida ocorre em 3 etapas distintas: a primeira, que vai da sulfitagem à trasfega após

as 24 horas de frio, com degradação rápida do pesticida, depois, da trasfega até o 3º dia de fermentação, com decaimento lento do pesticida, e finalmente, do 3º dia de fermentação até ao 7º dia (último dia em que se detectou o Diclofluanida), em que a degradação é um pouco mais rápida.

Verifica-se então que, apesar do Diclofluanida ter sido aplicado no dia anterior à vindima, o pesticida degrada-se completamente antes do processo de vinificação estar completo. Convém relembrar que a quantidade de pesticida aplicada foi a recomendada pelo fabricante, pelo que este comportamento será semelhante ao que acontecerá numa situação real.

Na tentativa de encontrar mais informação relativamente aos resultados obtidos, tentou-se adaptar o decaimento do pesticida a equações de cinética, nomeadamente nos passos da fermentação alcoólica e do tratamento pelo frio durante os quais não ocorrem processos físicos exercidos pelo operador, de onde possam resultar uma variação do comportamento dos pesticidas. Durante a fermentação alcoólica foram recolhidas 6 amostras: trasfega, 3º, 5º, 7º e 10º dia de fermentação e a trasfega após a fermentação. Considerou-se que a amostra da trasfega foi recolhida no dia 0, adaptando os tempos para as restantes amostras relativamente a essa referência. No caso do tratamento pelo frio, utilizaram-se apenas 3 amostras: trasfega após fermentação alcoólica, 5º dia de frio e vinho. Este estudo foi realizado da mesma forma para os restantes pesticidas.

A Figura 8.10 mostra com mais pormenor os teores obtidos para as dias fases da vinificação em estudo. Não foram obtidos quaisquer resultados para o tratamento pelo frio pois o pesticida já tinha desaparecido.

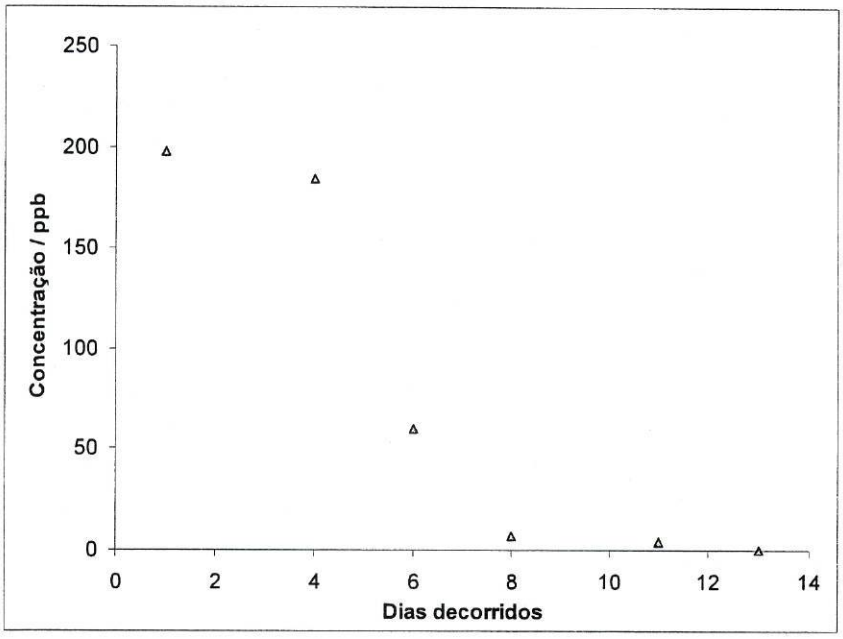


Figura 8.10 – Gráfico da variação do teor em Diclofluanida durante a fermentação alcoólica

Verificou-se que era possível adaptar estes resultados à lei de cinética de 1ª ordem (Tabela 8.3). Determinaram-se também os valores da velocidade específica, k, assim como o tempo de semi-vida de cada pesticida, t1/2, e para cada passo estudado [54].

Tabela 8.3 – Equação de cinética de 1ª ordem para a fermentação alcoólica, constante de velocidade e tempo de semi-vida, para o Diclofluanida

Passo	Declive	b	r
Fermentação	-0,4524	0,2592	0,9809
Passo	k (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)	
Fermentação	-0,04524	1,5	

Como foi referido no Capítulo 2, o tempo de semi-vida do Diclofluanida é de 8 dias. Assim, verifica-se que a degradação do pesticida é mais rápida durante a fermentação alcoólica de um mosto do que quando ele está presente em água. Não será alheio a este facto a actividade das leveduras e também o facto do meio ser bastante diferente de um meio aquoso.

8.3.4 Procimidona

O Procimidona foi analisado em conjunto com o Dicofol, como já tinha ocorrido na primeira fase de ensaios. Como já foi referido anteriormente, não foi possível encontrar sinais relativos ao Dicofol, apesar de tal ter sido possível nos ensaios realizados na primeira aplicação de pesticidas. Assim, foram realizadas as determinações dos dois pesticidas deste lote, tendo obtido resultados nulos para o Dicofol, e os que se apresentam seguidamente obtidos para o Procimidona.

A Tabela 8.4 mostra os resultados obtidos para as análises durante a fase de produção do vinho, enquanto a Figura 8.10 mostra o gráfico da concentração de Procimidona ao longo dos dias em que decorreu a vinificação.

Como se pode verificar, a concentração do Procimidona diminui drasticamente (quase 80%) na fase de precipitação das borras e posterior decantação. No entanto, nos dias seguintes e durante a fermentação alcoólica, a taxa de desaparecimento não é muito acentuada, o que não seria de se esperar já que é nesta fase que ocorrem as maiores transformações no mosto. Já na parte final da fermentação e nas etapas seguintes, a degradação do pesticida é bastante mais rápida. A razão para este facto é em tudo semelhante ao explicado para o Diclofluanida, isto é, o início tardio da fermentação alcoólica. Entre o 7º e o 10º dia de fermentação, a velocidade de degradação do pesticida é relativamente mais elevada, sendo que aumenta um pouco mais na fase final da fermentação. A última fase em que se encontra Procimidona é no engarrafamento do vinho. Em fases posteriores já não foi possível encontrar qualquer sinal relativo ao pesticida em questão.

Como se pode ver na Tabela 8.4, a concentração inicial de Procimidona foi de 1441 ppb. Depois das 24 horas de frio, a concentração passou para 291 ppb. Perdeu-se cerca de 80% do pesticida que se encontrava inicialmente. Tal como foi explicado para o Diclofluanida, não seria de se esperar um decaimento tão extenso num período de tempo relativamente curto e a baixa temperatura. As explicações para este comportamento podem ser a precipitação do pesticida a baixas temperatura, a maior afinidade pelas massas sólidas que se

depositaram, assim como ser a primeira exposição ao ar comportamento, de alguma forma semelhante ao que aconteceu para o Diclofluanida.

Após a trasfega, ocorreu a inoculação com leveduras, para iniciar a fermentação. Até ao 7º dia de fermentação, o decaimento decorreu de uma forma lenta, provavelmente porque a fermentação não estaria a ocorrer a grande velocidade. Assim, a concentração passou de 279 para 270 e finalmente para 266 ppb.

Tabela 8.4 – Variação do teor de Procimidona ao longo da produção do vinho

Fase do processo	Dias decorridos	Concentração (ppb)	% que resta	% que se perdeu	Velocidade (µg/l dia)
Sulfitagem	0	1441	100,00	-	-
Trasfega	1	291	20,19	79,81	1150
3º dia fermentação	4	279	19,36	4,12	4
5º dia fermentação	6	270	18,74	3,23	5
7º dia fermentação	8	266	18,46	1,48	2
10º dia fermentação	11	206	14,30	22,56	20
Trasfega após FA	13	154	10,69	25,24	26
5º dia de frio	18	52	3,61	66,23	20
Vinho	20	4	0,28	92,31	24
7º dia em garrafa	27	-	-	-	-
1 mês em garrafa	52	-	-	-	-

Já nas duas fases finais da fermentação alcoólica (10º dia de fermentação e na trasfega), a degradação do Procimidona ocorreu mais rapidamente, caindo de 266 ppb (7º dia de fermentação) para 206 (10º dia) e posteriormente para 154 ppb (trasfega). A velocidade manteve-se mais ou menos semelhante até ao fim do processo de vinificação. Daqui se retira que a velocidade de decaimento do pesticida não sofreu variações, o que significa que o processo de evolução do vinho se manteve constante.

A última fase em que é possível detectar o Procimidona é no engarrafamento. Após esta fase, não se encontra qualquer sinal relativo ao pesticida.

Observando a Figura 8.11, verifica-se que existem 3 fases de decaimento. A primeira, diferente de todas as outras que é da fase inicial até à trasfega. Depois, da trasfega até o 7º dia de fermentação, com um decaimento pouco rápido e, finalmente, do 7º dia de fermentação até o engarrafamento (último dia em que se detectou o pesticida), em que a velocidade de degradação foi consideravelmente mais rápida.

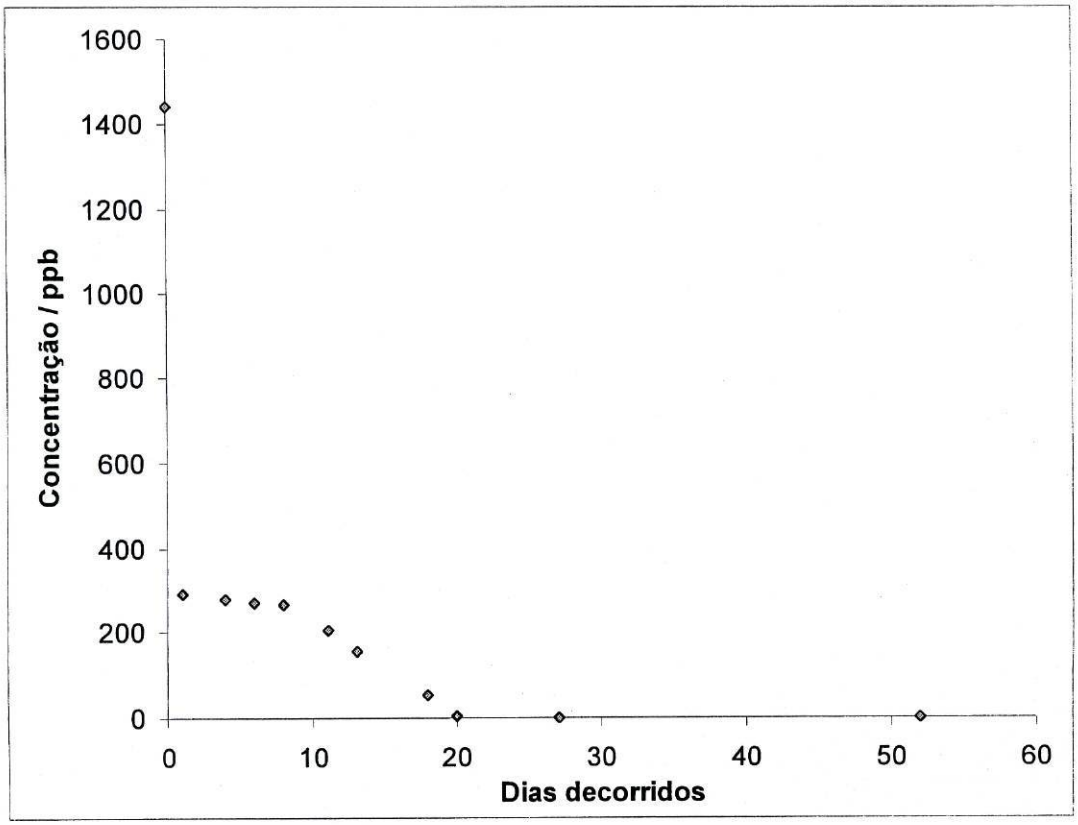


Figura 8.11 – Gráfico da variação do teor de Procimidona ao longo da produção do vinho

Apesar do pesticida ter sido aplicado no dia anterior à vindima, e nas quantidades habitualmente utilizadas em situações reais, este desapareceu perto da altura do engarrafamento, o que parece mostrar que o pesticida não chegaria ao consumidor, mesmo que tivesse sido aplicado no dia anterior à vindima.

A Tabela 8.5 e a Figura 8.12 apresentam os resultados obtidos no estudo da cinética do decaimento do Procimidona. Adaptaram-se os valores equações de 1ª ordem.

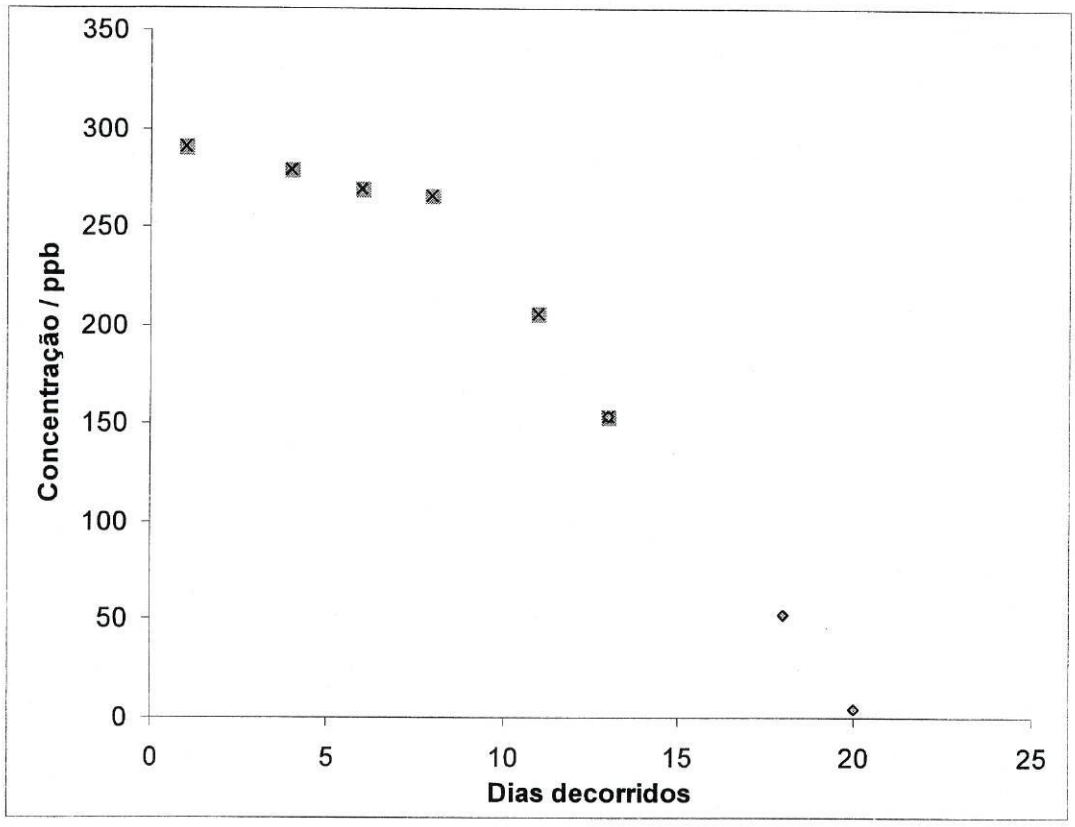


Figura 8.12 – Gráfico da variação do teor em Procimidona durante a fermentação alcoólica e tratamento pelo frio

Tabela 8.5 – Equação de cinética de 1ª ordem para a fermentação alcoólica e tratamento pelo frio, constante de velocidade e tempo de semi-vida, para o Procimidona

Passo	Declive	b	r
Fermentação	-0,0495	-1,4927	0,8918
Trat. pelo frio	-0,463	-1,963	0,8905
Passo	**k (dia^{-1})**	**$t_{1/2}$ (dias)**	
Fermentação	-0,0495	14,0	
Trat. pelo frio	-0,463	1,5	

Dos resultados retira-se que a velocidade de desaparecimento do Procimidona é maior durante o tratamento pelo frio do que durante a

fermentação alcoólica. Este comportamento é um pouco estranho e não usual. Seria de esperar o contrário. Como não foi possível encontrar qualquer referência sobre o tempo de semi-vida deste pesticida, não é possível comparar os resultados obtidos.

8.3.5 Vinclozolina

O Vinclozolina foi aplicado em conjunto com o Fenarimol. Como já foi referido anteriormente, não foi possível encontrar vestígios de Fenarimol nas amostras de uva e também não foi encontrado qualquer sinal durante as fases de vinificação. A Tabela 8.6 mostra os resultados obtidos para as análises durante a fase de produção do vinho. A Figura 8.13 mostra o gráfico da concentração de Vinclozolina ao longo dos dias em que decorreu a vinificação.

A concentração inicial de Vinclozolina foi de 2827 ppb. Após as 24 horas de frio e a trasfega, não houve variação da concentração do pesticida. O ligeiro aumento verificado é significativo em função da incerteza associada às determinações. Na trasfega, procedeu-se à inoculação do mosto com leveduras, para se iniciar a fermentação alcoólica. No 3º dia de fermentação, a concentração tinha baixado para 2531 ppb, uma diminuição de 10 %. Já para o 5º dia, não se verificou diminuição da concentração de forma significativa.

Tabela 8.6 – Variação do teor de Vinclozolina ao longo da produção do vinho

Fase do processo	Dias decorridos	Concentração (ppb)	% que resta	% que se perdeu	Velocidade (µg/l dia)
Sulfitagem	0	2827	100,00	-	-
Trasfega	1	2830	100,11	-0,11	-3
3º dia fermentação	4	2531	89,53	10,57	100
5º dia fermentação	6	2525	89,32	0,24	3
7º dia fermentação	8	1248	44,15	50,57	639
10º dia fermentação	11	758	26,81	39,26	163
Trasfega após FA	13	396	14,01	47,76	181
5º dia de frio	18	334	11,81	15,66	12
Vinho	20	301	10,65	9,88	17
7º dia em garrafa	27	245	8,67	18,60	8
1 mês em garrafa	52	81	2,87	66,94	7

Para o 7º dia, ocorreu uma diminuição de 50 %, passando para 1248 ppb; no 10º dia a concentração já era de 758 ppb, diminuindo 39 % relativamente ao

passo anterior. No último passo da fermentação alcoólica, em que se faz a trasfega, a concentração era de 396 ppb, diminuindo 48 %. Nestes três passos, a diminuição da concentração é bastante mais rápida devido à fermentação alcoólica.

Na semana de frio que antecede o engarrafamento, a concentração passa de 396 ppb (na trasfega), para 334 ppb (no 5º dia de frio) e finalmente para 301 ppb (no engarrafamento). A diminuição da concentração foi bastante mais lenta que nos passos anteriores, tendo o pesticida um comportamento semelhante ao que teve nas 24 horas de frio, no início da vinificação. Verifica-se então que o Vinclozolina não é eliminado tão rapidamente quando é exposto a baixas temperaturas. Finalmente, depois de engarrafado, foram efectuadas duas determinações, 7 dias e 1 mês após o engarrafamento. A concentração de Vinclozolina passou de 301 ppb (no engarrafamento), para 245 (ao 7º dia após engarrafamento) e finalmente para 81 ppb (1 mês após engarrafamento). Neste caso, o pesticida ainda permaneceu no vinho, mesmo depois do engarrafamento.

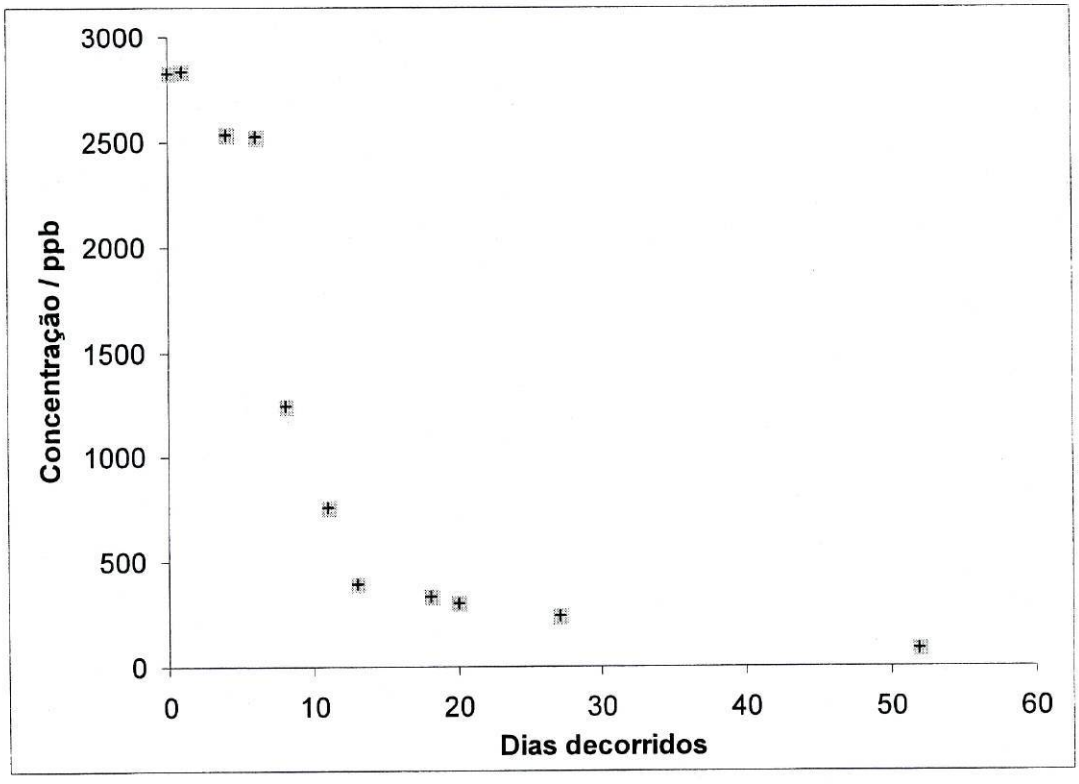


Figura 8.13 – Gráfico da variação do teor de Vinclozolina ao longo da produção do vinho

Observando a Figura 8.13, verifica-se que o Vinclozolina tem 3 etapas principais de decaimento: desde a sulfitagem até o 5º dia de fermentação, em que a degradação é algo lenta, do 5º dia de fermentação até a trasfega após a fermentação alcoólica, em que o decaimento se dá à maior velocidade e, finalmente, da trasfega até ao final do processo, em que a velocidade de degradação é novamente lenta.

A degradação do Vinclozolina é mais lenta e, portanto, leva mais tempo a desaparecer que os restantes pesticidas. Não será aconselhável utilizar este pesticida sem cumprir o período de segurança que lhe é aplicável, pois corre-se o risco de encontrar vestígios nos produtos.

A Tabela 8.7 e a Figura 8.14 apresentam os resultados obtidos no estudo da cinética do decaimento do Vinclozolina. Adaptaram-se os teores a equações de 1ª ordem, tanto no caso da fermentação alcoólica como no tratamento pelo frio.

Tabela 8.7 – Equação de cinética de 1ª ordem para a fermentação alcoólica e tratamento pelo frio, constante de velocidade e tempo de semi-vida, para o Vinclozolina

Passo	Declive	b	r
Fermentação	0,2494	1,0666	0,9897
Trat. pelo frio	-0,0382	1,961	0,9946
Passo	k (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)	
Fermentação	-0,2494	2,8	
Trat. pelo frio	-0,0382	18,1	

Como se pode observar nos resultados obtidos, o Vinclozolina tem um tempo de semi-vida de 2,8 dias segundo a variação ocorrida na fermentação alcoólica e de 18,1 dias no tratamento pelo frio. Conforme o referido no Capítulo 2, o tempo de semi-vida do Vinclozolina varia entre 3 dias a 3 semanas. Ora, isto significa que durante a fermentação o pesticida se degrada muito rapidamente, talvez se possa dizer até mais rapidamente do que o referido na literatura. Uma vez mais, razões para esse comportamento podem ser a actividade das leveduras e a matriz proporcionar condições para uma degradação mais rápida. Já no caso da degradação no frio, esta é bastante mais lenta, como seria de prever, mostrando que a temperatura é um factor que pode influenciar a velocidade de degradação de um pesticida. Outro aspecto a ter encontra é que o meio tem um teor etanólico mais elevado, podendo alterar a velocidade do decaimento.

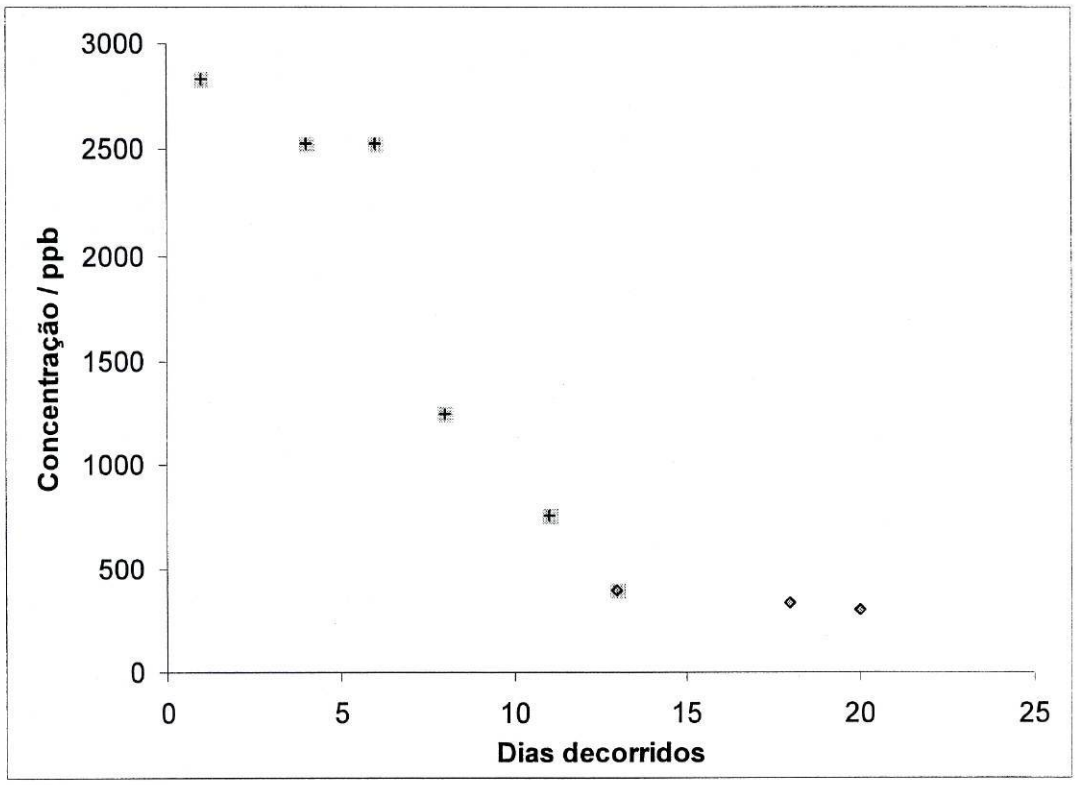


Figura 8.14 – Gráfico da variação do teor em Vinclozolina durante a fermentação alcoólica e tratamento pelo frio

8.3.5 Avaliação conjunta dos resultados

Importa nesta secção fazer todas as observações e considerações em relação ao conjunto de determinações realizadas.

Foram encontrados alguns trabalhos em que se descrevia o estudo da eliminação de pesticida em vinificações. No entanto as vinificações foram realizadas com uvas tintas e com processos de vinificação diferentes do usado [55,56]. Nestes artigos, com vários autores comuns, são feitas comparações entre o método de vinificação tradicional e o método de maceração carbónica. Referem também que o passo em que a eliminação dos pesticidas é mais extensa é a fermentação alcoólica.

Em primeiro lugar, interessa referir que não foram encontrados quaisquer outros sinais de pesticidas em todas as análises efectuadas, tanto dos pesticidas que foram aplicados ao longo da época de cultivo da vinha e cujos padrões foram analisados e os seus tempos de retenção determinados, como

de outros pesticidas desconhecidos. A identificação dos pesticidas dos quais não se possuíam informações foi feita utilizando as capacidades do espectrómetro de massa.

Foram encontrados alguns sinais de possíveis produtos de degradação dos pesticidas utilizados, fundamentalmente nas amostras das fases iniciais da vinificação. Essas espécies foram apresentadas no capítulo 6, aquando da descrição dos tempos de retenção de vários produtos. Acrescenta-se o facto dos sinais obtidos serem bastante pequenos, o que aponta para concentrações muito reduzidas desses produtos.

Foi já referido que não foi possível encontrar sinais dos pesticidas Fenarimol e Dicofol, apontando para a inexistência desses pesticidas nas amostras, pelo menos a concentrações iguais ou superiores aos limites de detecção. No entanto, como são pesticidas quimicamente muito semelhantes, pode inferir-se que o comportamento deva ser semelhante, isto é, que as razões porque não são detectados sejam as mesmas. Por outro lado, também é possível supor que os sinais não aparecem pela conjugação dos efeitos de matriz e da degradação rápida dos pesticidas.

Foram portanto estudados apenas 3 pesticidas: Diclofluanida, Procimidona e Vinclozolina. Importa também referir que estes pesticidas foram aplicados nas quantidades normais aconselhadas para o efeito, o que significa que as concentrações encontradas para cada um não têm relação entre si, isto é, o facto de termos uma concentração relativamente elevada do Vinclozolina não é relacionável com o facto de termos concentrações mais baixas do Diclofluanida, por exemplo. As aplicações foram efectuadas de forma independente e reproduzindo as condições presentes na utilização normal do referido pesticida na aplicação em vinha. A figura 8.15 mostra a evolução dos teores dos pesticidas ao longo da produção do vinho.

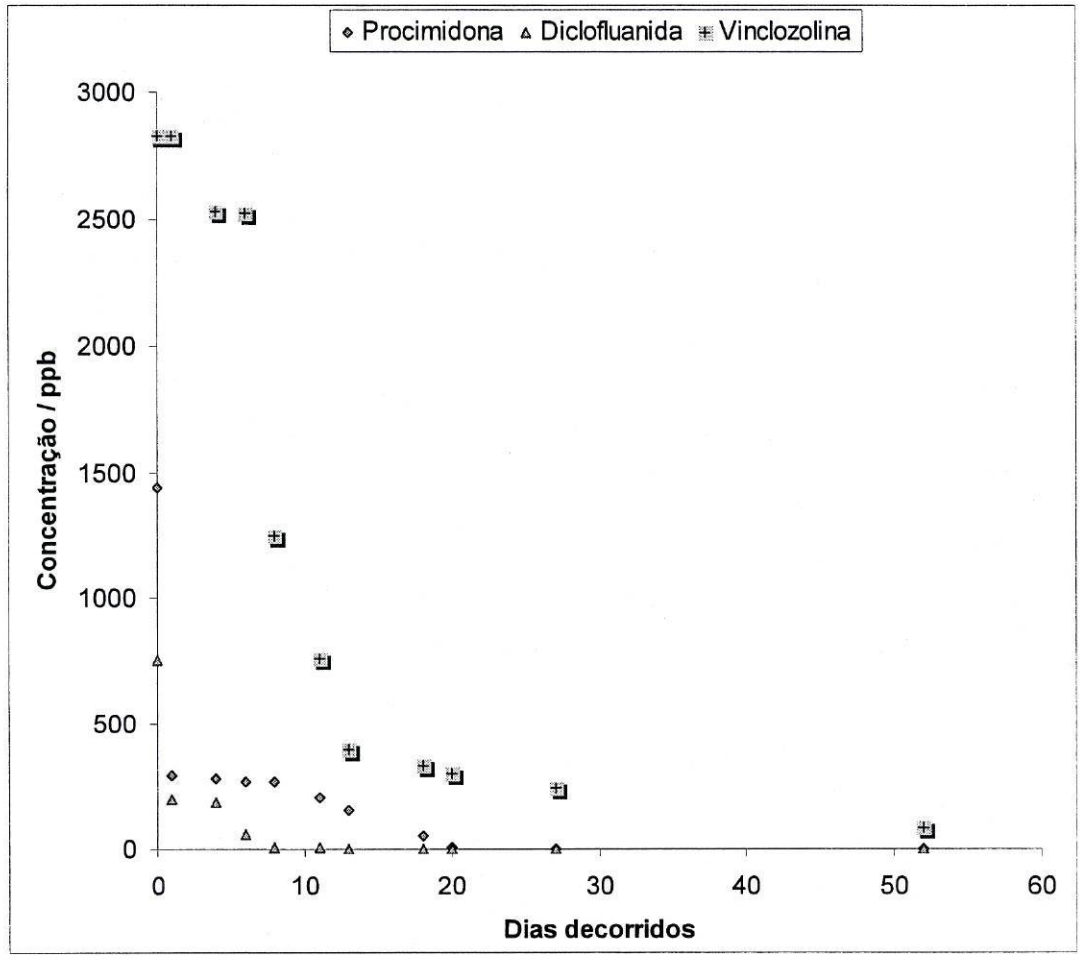


Figura 8.15 – Evolução dos teores dos pesticidas ao longo da produção do vinho

Como se pode ver na Figura 8.15, os passos preferenciais para a eliminação de cada pesticida não são coincidentes, isto é, os pesticidas não são eliminados mais rapidamente nas mesmas etapas do processo de vinificação. Ora, esta observação é interessante porque daqui se pode concluir que o processo de vinificação não influencia da mesma forma o desaparecimento dos pesticidas. Assim, não se pode pensar em formas da vinificação que provoquem uma eliminação mais rápida dos pesticidas, pelo menos de todos os pesticidas que possam existir no vinho, de forma a tornar os vinhos fitoquimicamente mais saudáveis. Se as indicações para a aplicação de pesticidas forem seguidas, nomeadamente as da Protecção Integrada, deverá ser difícil encontrar pesticidas no vinho, já que os pesticidas listados têm tempos de semi-vida relativamente curtos, e os intervalos de segurança sugeridos são suficientes para o desaparecimento dos produtos. No caso deste

estudo, esses intervalos de segurança não foram cumpridos pois desejava-se encontrar os pesticidas nas uvas, para ser possível seguir a sua degradação ao longo da produção.

O Diclofluanida, além da fase inicial da vinificação, sofre degradação durante a fermentação dado que a eliminação ocorre a uma taxa relativamente elevada já que passa de 184 a 4 ppb em apenas 7 dias. Já o Procimidona tem como passos preferenciais de eliminação aqueles em que é sujeito a baixas temperaturas e os posteriores ao início da fermentação, isto é, do 7º dia de fermentação em diante. Assim, no tratamento pelo frio, passou de uma concentração de 154 ppb para apenas 4 ppb, sendo que nos passos posteriores ao início da fermentação, a sua velocidade de eliminação é bastante regular e pelo menos 4 vezes superior à dos passos iniciais. O Vinclozolina não tem o mesmo tipo de comportamento, já que nesse período passou de 396 para 301 ppb. O Vinclozolina parece apontar que não é muito afectado pelos processos da vinificação. Aparte da altura da fermentação alcoólica, a eliminação do pesticida não varia muito, a não ser quando se encontra a baixas temperaturas.

Resumindo, os três pesticidas são eliminados principalmente com o decorrer da fermentação alcoólica, sendo que o Procimidona tem uma eliminação mais rápida após a fermentação. Neste comportamento, existem semelhanças entre os 3 pesticidas, apesar de estas serem algo ténues, principalmente em relação ao Procimidona.

Verificou-se também que o Diclofluanida e o Procimidona não são particularmente influenciados pelas baixas temperaturas, enquanto o Vinclozolina é muito dependente da temperatura. O comportamento do Diclofluanida e do Procimidona é algo estranho, já que seria de prever que a temperatura fizesse com que a eliminação fosse mais lenta. No entanto, deve-se lembrar que esta consideração é feita relativamente ao período das 24 horas de frio, logo no início da vinificação, em que se dá também o primeiro contacto com o ar. Também o facto de estarem a uma temperatura baixa pode induzir a precipitação dos produtos ou então pode-se sugerir a eliminação dos pesticidas através da maior afinidade pelas massas sólidas que se vão depositando. Já o Vinclozolina tem o comportamento que seria de esperar, pelo que, a baixas temperaturas, a sua concentração permanece quase inalterada.

Relativamente às velocidades de eliminação, o Vinclozolina é o que apresenta valores mais elevados. O Diclofluanida tem velocidades medianas e o Procimidona tem a eliminação mais lenta. No entanto, a velocidade de eliminação não significa que o pesticida desapareça mais rapidamente já que importa também a quantidade inicial presente. Assim, o Diclofluanida é o pesticida que desaparecera mais depressa pois demorou apenas 11 dias a desaparecer. No caso do Procimidona, o seu total desaparecimento demorou cerca de 20 dias. Quanto ao Vinclozolina, ao fim de 52 dias ainda era possível detectar a sua presença. No entanto, o Diclofluanida era o pesticida que partia de uma menor quantidade inicial (752 ppb), seguido do Procimidona (1441 ppb) e só depois o Vinclozolina (2827 ppb).

É importante aferir quais os passos principais na degradação dos pesticidas. Para o avaliar vai-se indicar a percentagem eliminada nos passos principais da vinificação: decantação, fermentação alcoólica e tratamento pelo frio. Assim, determinou-se as quantidades eliminadas em cada um destes passos e calculou-se qual a percentagem que representavam da concentração inicial do pesticida. A fermentação alcoólica engloba as amostras desde a trasfega até à trasfega após fermentação, enquanto o tratamento pelo frio vai desde a trasfega após fermentação até ao vinho engarrafado. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.8.

Tabela 8.8 – Percentagens de eliminação em cada fase da vinificação

	% do total perdida em cada processo		
	Vinclozolina	Diclofluanida	Procimidona
Decantação	-0,11	73,67	79,81
Fermentação	86,10	26,33	9,51
Tratamento pelo frio	3,36	-	10,41
Outros factores	10,65	0,00	0,28

Observando os dados expostos, verifica-se que a decantação é o passo mais importante para a eliminação do Diclofluanida e do Procimidona, sendo que as percentagens eliminadas são superiores a 70%. Já no caso do Vinclozolina, é a fermentação que assume o papel de ser responsável pela maior eliminação do

pesticida. Como já foi referido acima, o facto de ocorrer uma eliminação tão extensa do Diclofluanida e do Procimidona durante a decantação pode levar a pensar que estes pesticidas têm maior afinidade pelas massas do interior dos bagos de uva (que são uma parte considerável do precipitado que se forma durante o processo) do que pelo mosto, podendo também ocorrer precipitação destes pesticidas. O facto do Vinclozolina não ser eliminado nesta etapa significa que não se encontra nas massas internas dos bagos mas sim à superfície do bago, junto à película. Assim, pode-se pensar que, à excepção dos casos particulares em que acontecerá a eliminação dos pesticidas em conjunto com os detritos originados pela produção vínica, a etapa em que ocorre uma eliminação mais extensa e também mais rápida dos pesticidas será a fermentação alcoólica. No entanto, importa referir que estas conclusões se podem retirar apenas para os casos dos pesticidas estudados e para o tipo de vinificação realizado. Se a vinificação for de uvas tintas ou então com introdução de outros processos, como a colagem referida no Capítulo 1, as velocidades e extensões do decaimento podem ser alteradas.

É feita agora a sua comparação dos valores obtidos na avaliação das cinéticas dos decaimentos dos 3 pesticidas. Os resultados relativos à fermentação alcoólica encontram-se na Tabela 8.9 e os do tratamento pelo frio na Tabela 8.10. A Tabela 8.11 mostra os valores das velocidades específicas e dos tempos de semi-vida.

Tabela 8.9 – Equações de cinética de 1ª ordem para a fermentação alcoólica

Pesticida	Declive	b	r
Vinclozolina	-0,2494	1,0666	0,9897
Diclofluanida	-0,4524	0,2592	0,9809
Procimidona	-0,0495	-1,4927	0,8918

Tabela 8.10 – Equações de cinética de 1ª ordem para o tratamento pelo frio

Pesticida	Declive	b	r
Vinclozolina	-0,0382	1,961	0,9946
Diclofluanida	-	-	-
Procimidona	-0,463	-1,963	0,8905

Tabela 8.11 – Constantes de velocidade e tempos de semi-vida

	Fermentação alcoólica		Tratamento pelo frio	
Pesticida	k (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)	k (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)
Vinclozolina	-0,2494	2,8	-0,0382	18,1
Diclofluanida	-0,04524	1,5	-	-
Procimidona	-0,0495	14,0	-0,463	1,5

Verifica-se então que os decaimentos dos pesticidas se adaptam a equações de 1ª ordem, sendo o caso do Procimidona aquele que apresenta o pior ajuste. Relativamente aos valores dos tempos de semi-vida encontrados, estes são menores do que os encontrados na bibliografia. A esse facto não são alheias as transformações que ocorrem durante os períodos estudados (fundamentalmente no caso da fermentação alcoólica), a temperatura a que se encontram as amostras e também às diferenças de matriz. Assim, os valores dos tempos de semi-vida encontrados para a fermentação alcoólica são, em geral, inferiores aos referidos na literatura, o que pode levar a concluir que a actividade biológica existente durante esse período e as transformações químicas do meio levam a uma degradação mais rápida do pesticida. Por outro lado, no caso do Vinclozolina verifica-se que o tempo de semi-vida para a fermentação é muito inferior ao calculado para o tratamento pelo frio, mostrando então a importância temperatura. O caso do Procimidona apresenta um tempo de semi-vida para a fermentação superior ao do tratamento pelo frio, o que aparenta ser um contra censo. De facto, não seria de esperar que a eliminação ocorresse mais rapidamente a baixas temperaturas. Uma explicação para o facto pode ser a precipitação com os sais tartáricos que se precipitam durante a fase de frio.

Termina-se assim a descrição do trabalho e dos resultados obtidos.

Importa referir neste local algumas das dificuldades sentidas durante o trabalho e que levaram a que os objectivos inicialmente traçados tivessem de ser alterados ou que não tivessem tido o sucesso desejável.

Um dos primeiros problemas foi o facto de não ser possível realizar os ensaios noutra altura do ano senão a partir de Setembro. A cultura da vinha, como de qualquer outro tipo de cultura do nosso país, tem épocas bem marcadas e, por isso, não é possível recolher amostras ou efectuar vinificações senão em alturas bem determinadas. Uma pequena incorrecção em relação ao tempo em que as acções devem ser tomadas pode significar a perda da qualidade do vinho ou até a perda de parte significativa da colheita, tal como se explicou no Capítulo 1. Por este motivo, toda a calendarização do trabalho teve de depender da altura previsível da vindima, o que é sempre complicado devido à alteração constante do estado do tempo. Por exemplo, a data para os ensaios do estudo sobre os pares dos pesticidas teve de ser alterada algumas vezes, assim como a data em que se vindimou. Estas alterações provocaram também que se tivesse de realizar os referidos testes de avaliação dos pares de produtos ainda antes do método estar desenvolvido e caracterizado.

Outro problema que complicou bastante o trabalho e que acentuou as dificuldades quando conjugado com o problema referido acima foram as constantes avarias que o aparelho GC-MS teve. Esses problemas trouxeram atrasos e provocaram que os ensaios se prolongassem por um período de tempo demasiado longo, afectando também a redacção deste texto. Uma das avarias, relativas à bomba turbo-molecular, que cria o vácuo no espectrómetro de massa, deve ter-se manifestado mais tarde do que a sua ocorrência pois foi necessário repetir bastantes ensaios devido aos resultados não serem concordantes nem terem correspondência entre si.

As dificuldades sentidas fizeram com que os resultados obtidos estivessem aquém do projectado e esperado.

Capítulo 9 – Conclusões

Índice

CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES **251**

9.1 Conclusões

Do trabalho efectuado, retiram-se as seguintes conclusões principais:

O método proposto é capaz de quantificar os pesticidas Diclofluanida, Dicofol, Procimidona e Vinclozolina em amostras de vinho, de uvas e outras matrizes recolhidas durante a vinificação. É capaz de identificar alguns dos produtos de degradação desses pesticidas, assim como vários outros pesticidas utilizados frequentemente nas vinhas e também alguns pesticidas cuja utilização se encontra proibida (nomeadamente organoclorados).

O método apresenta uma zona de resposta linear, para os pesticidas estudados, no intervalo de concentração de 10 a 100 ppb, com desvios-padrão relativos inferiores a 15 % e limites de detecção em amostras de água e vinho inferiores a 4,1 ppb. Os limites de detecção em uvas são mais elevados, estando no entanto abaixo das concentrações máximas permitidas por lei.

É provável que os pesticidas Dicofol e Fenarimol tenham uma eliminação demasiado rápida e por isso não foram detectados durante todo o processo de vinificação.

O Diclofluanida e o Procimidona são eliminados preferencialmente durante a fase da decantação, enquanto o Vinclozolina é eliminado durante a fermentação. Estes dois pesticidas devem precipitar a baixas temperaturas ou então possuir uma maior afinidade pela polpa do bago já que são eliminados com a deposição das massas sólidas a 0º C.

De uma forma geral, verificou-se que a fermentação é o passo em que a eliminação ocorre numa extensão maior.

A velocidade de eliminação dos pesticidas durante a produção do vinho é superior à sua velocidade em soluções aquosas, como referida na bibliografia.

Mostrou-se que, se forem cumpridas as regras de segurança da Protecção Integrada, não se encontrarão pesticidas no vinho engarrafado.

Seria interessante realizar uma comparação das capacidades do método de extracção com um outro alternativo, por exemplo a extracção em fase sólida (SPE). Esse método serviria para confirmar a validade das conclusões retiradas mas também poderia permitir o estudo de outros pesticidas, de forma

a conhecer melhor o comportamento dos diversos produtos que são utilizados na vinha.

Bibliografia

[1] M. Chauvet, A. Reynier, Manuel de Viticulture, Tradução de J. Gaspar, Litexa Portugal, Lisboa, 1984

[2] C. Carrera, Noções sobre a vinha e o vinho em Portugal, in http://www.lusawines.com/

[3] Comissão de Viticultura da região dos Vinhos Verdes, Vinho Verde em Portugal, in http://www.vinhoverde.pt/

[4] Bayer Crop Science Portugal, in http://www.agro.bayer.com.pt/internet/asp/default.asp

[5] História do Vinho, in http://www.e-mercatura.net

[6] E. Peynaud, Connaissance et Travail du Vin, Tradução de M. F. B. Ripado, Litexa Editora Lda., Lisboa, 1993

[7] O. Pato, O Vinho – Sua Preparação e Conservação, Clássica Editora, Lisboa, 1998

[8] D. Delanoe, C. Maillard, D. Maisondieu, Le vin – De l'analyse à l'élaboration, Tradução de R. Casquilho, Publicações Europa-América Lda., Mem Martins, 1989

[9] M. A. Amerine, C. S. Ough, Methods for Analysis of Musts and Wines, 2ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., Davis, 1988

[10] Oregon State University, Human Impacts on Ecosystems, in http://oregonstate.edu/instruction/bi301/agpestic.htm

[11] Bayer Crop Science, Manual Protecção Integrada em Vinha, Lisboa, 2003

[12] Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Produção Integrada da Vinha, DGPC, Oeiras, 2000

[13] U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Pest Management (IPM) and Food Production, in http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/ipm.htm

[14] E. Fernandes, C. J. Reis, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos – Lista dos Produtos com Venda Autorizada, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Oeiras, 2003

[15] Pesticide Information Profiles, The Extension Toxicology Network - Extoxnet, in http://extoxnet.orst.edu/

[16] M. Teixeira, E. Fernandes, Limites Máximos de Resíduos de Produtos Fitofarmacêuticos Autorizados em Portugal, Direcção-Geral das Culturas, Oeiras, 2001

[17] M. L. S. S. Gonçalves, Métodos Instrumentais para Análise de Soluções – Análise Quantitativa, 3ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996

[18] H. A. Strobel, W. R. Heineman, Chemical Instrumentation: a Systematic Approach, 3ª Edição, John Wiley & Sons, New York, 1989

[19] H. J. C. das Neves, A. M. C. Freitas, Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução, Dias de Sousa, Lda., Póvoa de Santa Iria, 1996

[20] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 7ª Edição, Saunders College Publishing, New York, 1996

[21] G. A. Eiceman, Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000

[22] P. A. Sewell, B. Clarke, Chromatografic Separations (Analytical Chemistry by Open Learning), John Willey & Sons, London, 1987

[23] J. Pawliszyn (Ed.), Applications of Solid Phase Microextraction, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999

[24] A. L. P. Valente, F. Augusto, Quím. Nova 23, nº 4 (2000)

[25] Supelco, A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction, Bulletin 929, Supelco SPME, http://www.sigma-aldrich.com/supelco

[26] Supelco, Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide, Bulletin 928, Supelco SPME, http://www.sigma-aldrich.com/supelco

[27] Galipo, J. Chem. Educ., 76 (1999), 245

[28] G. J. Soleas, J. Yan, K. Hom e D. M. Goldberg, J. of Chromatogr. A, 882 (2000), 205

[29] F. J. Arrebola, J. L. M. Vidal, M. Mateu-Sánchez, F. J. Alvarez-Castellón, Anal. Chim. Acta, 484 (2003) 167

[30] J. J. Jiménez, J. L. Bernal, M. J. Nozal, L. Toribio, E. Arias, J. Chromatogr. A, 919 (2001) 147

[31] S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, J. Chromatogr. A, 882 (2000) 221

[32] D. A. Lambropoulou, I. K. Konstantinou, T. A. Albanis, J. Chromatogr. A, 893 (2000) 143

[33] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, Fresenius J. Anal. Chem., 369 (2001) 647

[34] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A, 889 (2000) 59

[35] J. Oliva, S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, J. Chromatogr. A, 833 (1999) 43

[36] J. Oliva, A. Barba, N. Vela, F. Melendreras, S. Navarro, J. Chromatogr. A, 882 (2000) 213

[37] T. Hyötyläinen, T. Tuutijärvi, K. Kuosmanen, M.L. Riekkola, Anal. Bional. Chem., 372 (2002) 732

[38] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, J. Chromatogr. A, 928 (2001) 117

[39] M. M. Galera, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, P. P. Vázquez, J. Chromatogr. A, 799 (1998) 149

[40] F. C. Silva, Z. L. Cardeal, C. R. Carvalho, Quím. Nova, 22, nº 2 (1999)

[41] J. Salafranca, C. Domeño, C. Fernández, C. Nerín, Anal. Chim. Acta, 477 (2003) 257

[42] D. A. Lambropoulou, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, Anal. Bioanal. Chem., 374 (2002) 932

[43] A. B. Deger, T. J. Gremm, F. H. Frimmel, L. Mendez, Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 61

[44] A. A. Boyd-Boland, S. Magdic, J. B. Pawliszyn, Analyst, 121 (1996) 929

[45] F. E. Ahmed, Trends in Anal Chem, 20, nº 11 (2001) 649

[46] H. D. Burrows, M. Canle, J. A. Santaballa, S. Steenken, J. Photochemistry and Photobiology B: Biology, 67 (2002) 71

[47] A. Laganà, A. Bacaloni, I. Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal Chim Acta, 462 (2002) 187

[48] M. C. D. A. Mateus, A. M. Silva, H. D. Burrows, Chemosphere, 48 (2002) 363

[49] M. A. Sarkar, P. K. Biswas, S. Roy, R. K. Kole, A. Chowdhury, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 63 (1999) 604

[50] M. Ueoka, G. Allinson, Y. Kelsall, M. Graymore, F. Stagnitti, Chemosphere, 35, nº 12 (1997) 2915

[51] A. Vanni, R. Gamberini, A. Calabria, P. Nappi, Chemosphere, 41 (2000) 1431

[52] V. A. Sakkas, I. K. Konstantinou, T. A. Albanis, J. Chromatogr. A, 930 (2001) 135

[53] J. C. Miller, J. N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, 2ª Edição, Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1984

[54] P. W. Atkins, Physical Chemistry, 6ª Edição, Oxford University Press, Oxford, 1998

[55] S. Navarro, A. Barba, J. Oliva, G. Navarro, F. Pardo, J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 264

[56] S. Navarro, J. Oliva, A. Barba, G. Navarro, M. A. Garcia, M. Zamorano, J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 3537