

Mestrado Integrado em Engenharia Química

2,4,6-tricloroanisol em rolhas de cortiça natural: eficácia do equipamento de deteção individual na prevenção da contaminação de vinhos

Tese de Mestrado

de

Flávia Patrícia Matos Pais de Figueiredo

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

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



Orientador na FEUP: Prof. Doutora Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos, S.A.: Prof. Doutor Miguel Cabral

Departamento de Engenharia Química

fevereiro de 2014

Agradecimentos

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.” Albert Einstein. Assim, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e que, de alguma forma, abriram a minha mente fazendo-a crescer.

Antes de mais agradeço a oportunidade de realizar esta dissertação de mestrado no Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Amorim & Irmãos, S.A..

Aos meus orientadores. Ao Prof. Doutor Miguel Cabral pela oportunidade, por todo o acompanhamento prestado e pela competência e dedicação demonstradas e transmitidas nos mais variados momentos. À Prof. Doutora Margarida Bastos pela disponibilidade, dedicação e ensinamentos transmitidos não só neste projeto como ao longo do meu percurso académico.

Ao Doutor Paulo Lopes, pela orientação, ideias e ajuda ao longo do projeto. À Dr.^a Isabel Roseira, por toda a simpatia e boa disposição com que me presenteou durante estes 5 meses.

Às pessoas com quem convivi diariamente ao longo deste percurso. Aos colaboradores do I&D Ana Malheiro, Carlos Costa, Eliana Reis, Patrícia Oliveira e Salomé Reis por todos os conhecimentos transmitidos, pelo companheirismo e por todos os bons momentos que ajudaram na minha integração e criaram um bom ambiente propício à realização deste projeto. Às minhas colegas de estágio, Paula Silva e Magda Sá, com quem partilhei esta importante caminhada. Bem como aos colaboradores do LabCork pelo convívio, bons momentos e disposição a ajudar.

Aos meus amigos, Sara Campos, Bárbara Libório e Jerome Alexandre, que mesmo longe estiveram sempre por perto, que a cada dia me ajudam a crescer e com os quais a alegria é espontânea e constante. E a todos aqueles com quem me cruzei e que, de alguma forma, contribuíram para quem hoje sou.

Ao Christophe Vieira, o meu sincero reconhecimento. Agradeço principalmente pela paciência e pela presença, quer no fim dos dias mais complicados quer dos mais gratificantes, com um abraço e sorriso para mim.

Ao meu pai, que me ensinou a não seguir por caminhos já trilhados mas a fazer o meu próprio caminho. À minha mãe, pelos sorrisos arrancados, pela paciência e amor. E aos meus irmãos, Paulo, Fátima e Filomena, que apesar de não os ter escolhidos, não podia ter tido melhor! A estes as minhas desculpas pelos momentos menos bem-humorados e o maior obrigado por tornarem tudo isto possível.

Resumo

O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em rolhas de cortiça natural é uma problemática de extrema importância para a indústria corticeira. A empresa Amorim e Irmãos, S.A. é detentora de um equipamento de deteção individual de TCA, designado por MDI, em rolhas de cortiça natural.

O presente projeto tem como objetivo analisar a eficácia da MDI na prevenção da contaminação de vinhos por TCA, a fim de estudar a possibilidade de inserção do protótipo na escala industrial de produção de rolhas.

O equipamento foi validado por análise de um lote de rolhas na MDI e posterior análise pelo método de rotina utilizado no departamento de I&D da A&I, SPME-GC-ECD. O risco de contaminação destas rolhas enquanto vedantes de um vinho branco foi estudado usando uma seleção de rolhas no engarrafamento e posterior análise ao vinho após diferentes períodos de engarrafamento.

Com a resolução das limitações encontradas (descida de temperatura do detetor e eliminação de “falsos positivos”) já em fase avançada de desenvolvimento, a deteção individual de TCA por volatilização térmica permitirá à indústria rolheira um aumento da qualidade do produto produzido. A introdução deste método de deteção no processo produtivo permitirá a deteção prévia da contaminação eliminando essas rolhas do sistema.

Palavras Chave (Tema): 2,4,6-TCA, rolhas de cortiça natural, análise individual de TCA

Abstract

In natural cork stoppers, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is an important issue in the cork industry. The company Amorim e Irmãos, S.A. owns an equipment which allows the individual detection of TCA in natural cork stoppers and it is called MDI.

This project aims to analyse the effectiveness of MDI in the contamination's prevention of the wines by TCA, with the objective to study the possibility to introduce the prototype at industrial scale production of stoppers.

The equipment was validated by analysis of a batch of stoppers in MDI and subsequent analysed by routine method used in Research & Development department of A&I, SPME-GC-ECD. The risk of contamination of these stoppers, as seals of white wine, was studied using a selection of stoppers to bottling and further wine analysis after different bottling periods.

With the resolution of the found limitations (decrease of the detector's temperature and elimination of the "false positives") in an advanced stage of development, the individual detection of TCA by thermal volatilization allows the cork industry to increase the quality of the produced product. The introduction of this method of detection in the production process will allow a prior detection of contamination, eliminating these stoppers of the system.

Declaração

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

Porto, 27 de janeiro de 2014

(Flávia Figueiredo)

Índice

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução..... | 1 |
| 1.1 | Enquadramento e Apresentação do Projeto | 1 |
| 1.2 | Apresentação da Empresa | 1 |
| 1.3 | A cortiça | 2 |
| 1.4 | Compostos contaminantes do vinho | 2 |
| 1.5 | 2,4,6 - Tricloroanisol (TCA) | 3 |
| 1.6 | Contributos do Trabalho | 4 |
| 1.7 | Organização da Tese | 5 |
| 2 | Contexto e Estado da Arte | 6 |
| 3 | Descrição Técnica..... | 10 |
| 3.1 | Validação do equipamento de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural | 10 |
| 3.1.1 | Deteção individual de TCA | 10 |
| 3.1.2 | Descrição do equipamento | 10 |
| 3.1.3 | Modo operatório..... | 12 |
| 3.2 | Engarrafamento | 12 |
| 3.2.1 | Modo operatório..... | 12 |
| 4 | Discussão de Resultados | 14 |
| 4.1 | Validação do equipamento de deteção individual de TCA | 14 |
| 4.3 | Análise do vinho após diferentes períodos de engarrafamento | 17 |
| 4.3.1 | Após 1 mês de engarrafamento..... | 17 |
| 4.3.2 | Após 2 meses de engarrafamento | 18 |
| 5 | Conclusões | 21 |
| 6 | Avaliação do Trabalho Realizado | 22 |
| 6.1 | Objetivos Realizados | 22 |
| 6.2 | Outros Trabalhos Realizados..... | 22 |
| 6.3 | Limitações e Trabalho Futuro | 22 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 6.4 | Apreciação final | 23 |
| 7 | Referências | 25 |
| Anexo 1 | Especificações do equipamento de detecção individual de TCA..... | 28 |
| Anexo 2 | Análise por SPME-GC-ECD para confirmação de resultados..... | 29 |
| | Descrição do equipamento | 29 |
| | Modo operativo..... | 29 |
| | Especificações | 30 |
| Anexo 3 | Análise dos vinhos por SPME-GC-MS | 31 |
| | Descrição do equipamento | 31 |
| | Modo operativo..... | 31 |
| | Especificações | 32 |
| Anexo 4 | Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento (rolhas positivas) | 33 |
| Anexo 5 | Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento (rolhas negativas) | 35 |
| Anexo 6 | Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento (rolhas positivas) | 37 |
| Anexo 7 | Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento (rolhas negativas)..... | 39 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Máquina de deteção individual de TCA. Constituída por: a) alimentação; b) incubação; c) análise cromatográfica e d) segregação. | 11 |
| Figura 2 - Linha de engarrafamento..... | 13 |
| Figura 3 - Cromatograma de um pico de TCA integrado com a) $T_{coluna} = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$ e b) $T_{coluna} = 96\text{ }^{\circ}\text{C}$ | 15 |
| Figura 4 - Cromatograma de um falso positivo integrado pelo software. | 16 |
| Figura 5 - Concentração de TCA nos vinhos analisados após 1 mês de engarrafamento. | 17 |
| Figura 6 - Concentração de TCA nos vinhos analisados após 2 meses de engarrafamento. | 18 |
| Figura 7 - Correlação de TCA: rolha negativas versus vinho após 2 meses de engarrafamento. | 19 |
| Figura 8 - Correlação de TCA: rolha positivas versus vinho após 2 meses de engarrafamento. | 19 |
| Figura A2.1 - Equipamento de análise por SPME-GC-ECD: a) autosampler e b) cromatógrafo..... | 29 |
| Figura A2.2 - Padrão interno: 2,3,6-tricloroanisol. | 30 |
| Figura A3.1 - Equipamento de análise por SPME-GC-MS: a) autosampler b) cromatógrafo c) detetor. ... | 31 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Compostos responsáveis pela contaminação do vinho com aromas a mofo e bafio. | 3 |
| Tabela 2 - Resultados da maceração conjunta de 60 rolhas (6 soaks de 10 rolhas cada)..... | 14 |
| Tabela 3 - Caracterização do lote por análise de TCA (SPME-GC-ECD) em rolhas antes da MDI. | 14 |
| Tabela 4 - Validação da MDI por análise de TCA em 800 rolhas negativas e todas as rolhas positivas. ... | 15 |
| Tabela 5 - Gamas de TCA obtidas nos vinhos após os dois meses de engarrafamento. | 20 |
| Tabela A4.1 - Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas positivas pela MDI..... | 33 |
| Tabela A5.1 - Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas negativas pela MDI..... | 35 |
| Tabela A6.1 - Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas positivas pela MDI..... | 37 |
| Tabela A7.1 - Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas negativas pela MDI..... | 39 |

Notação e Glossário

Letras gregas

| | |
|----------|----------------------|
| β | beta (emissões beta) |
| γ | gama (radiação gama) |

Lista de Siglas

| | |
|------|---|
| A&I | Amorim e Irmãos, S.A. |
| CRT | <i>Consumer Rejection Threshold</i> (Limite de Rejeição do Consumidor) |
| DT | <i>Detection Thresholds</i> (Limite de Deteção) |
| ECD | <i>Electronic Capture Detection</i> (Deteção por Captura Eletrónica) |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa) |
| I&D | Investigação e Desenvolvimento |
| kGy | Kilogray - unidade de medida da radiação absorvida |
| lq | limite de quantificação de TCA = 0,5 ng/L |
| MBq | Megabequerel - unidade de medida da radioatividade (1Bq = 1 s ⁻¹) |
| MDI | Máquina de Deteção Individual de TCA |
| MDMP | 2-metóxi-3,5-dimetilpirazina |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espetrometria de Massa) |
| PCA | pentacloroanisol |
| PCP | pentaclorofenol |
| SPME | <i>Solid Phase Micro Extraction</i> (Microextração em Fase Sólida) |
| TBA | 2,4,6 - tribromoanisol |
| TCA | 2,4,6 - tricloroanisol |
| TCP | 2,4,6 - triclorofenol |
| TeCA | 2,3,4,6 - tetracloroanisol |
| TeCP | 2,3,4,6 - tetraclorofenol |

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em rolhas de cortiça natural é uma problemática de extrema importância para a indústria corticeira. A empresa Amorim e Irmãos, S.A. é detentora de um equipamento de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural, sendo objetivo do presente projeto estudar a eficácia desse na prevenção da contaminação de vinhos.

1.2 Apresentação da Empresa

Atualmente, a cortiça possui aplicações não só em produtos tradicionais de alto valor acrescentado, como é o caso da rolha, mas também em produtos que incorporam avançada tecnologia de fabrico e elevados padrões de Investigação e Desenvolvimento (I&D). Desta forma, a Corticeira Amorim disponibiliza um vasto portfólio de produtos de elevada qualidade, para incorporação em indústrias tão diversificadas e exigentes como são a indústria aeronáutica, de construção ou vinícola. A Corticeira Amorim detém 35 % da transformação mundial de cortiça (Amorim, 2013).

O Grupo Amorim, criado em 1870, é hoje uma das maiores, mais empreendedoras e dinâmicas multinacionais de origem portuguesa. Detém uma posição de liderança mundial na indústria da cortiça, atividade que constitui ainda hoje o seu *core business*, apesar da contínua diversificação dos negócios para áreas como os têxteis e a promoção e desenvolvimento de produtos naturais de elevada qualidade, como o vinho do Porto e os vinhos de mesa. A Corticeira Amorim é a maior empresa mundial de produtos de cortiça e uma das mais internacionais de todas as empresas portuguesas, com operações em dezenas de países, de todos os continentes (Amorim, 2013).

A empresa possui cinco unidades de negócio principais: matérias-primas, rolhas (Amorim e Irmãos, S.A.), revestimentos, aglomerados compósitos e isolamentos.

Nos últimos anos a Amorim & Irmãos, S.A. investiu milhões de euros em I&D, tendo concentrado a sua atuação principalmente no desempenho sensorial e técnico das rolhas de cortiça. A prioridade número um do departamento de I&D, liderado pelo Prof. Doutor Miguel Cabral, baseia-se no combate ao TCA, composto responsável pelo aroma a mofo/terroso (internacionalmente conhecido por GMT), encontrado em alguns vinhos.

1.3 A cortiça

A cortiça é um tecido vegetal que reveste o tronco do sobreiro, *Quercus suber L.*, sendo assim um material 100 % natural. Esta é formada por células microscópicas preenchidas com um gás semelhante ao ar e cujas paredes celulares são formadas predominantemente por polímeros como a suberina (39,4 % ± 1,7), lenhina (24,0 % ± 0,8) e polissacáridos (19,9 % ± 2,6) apresentando também outros compostos extrativos, ceroides e compostos fenólicos (14,2 % ± 1,1) e cinzas (1,2 % ± 0,2) (Fortes *et al.*, 2004). O sobreiro apresenta uma longevidade entre 250-350 anos e tem a capacidade de regenerar a sua casca, permitindo assim a sua exploração prolongada. A cortiça apresenta propriedades de impermeabilidade, compressibilidade, elasticidade e longevidade, que tornam a rolha de cortiça natural, principal produto produzido a partir da cortiça, um produto de excelência para vedação de garrafas de vinho (Fortes *et al.*, 2004). No entanto a cortiça, devido às suas propriedades, apresenta inúmeras aplicações tais como revestimento de casas e mobiliário, componentes para interiores de autocarros, comboios de alta velocidade e aviões, moda como vestuário e calçado e lazer e artes plásticas (AmorimCork, 2014).

O descortiçamento, extração da casca do sobreiro, só é permitido, por lei, quando o perímetro da árvore à altura do peito, (PAP) atinge os 70 cm, o que acontece após 20-35 anos da sua existência. Nesta fase é extraída a designada cortiça virgem, utilizada para granular e posterior utilização no fabrico de pavimentos e revestimentos. Este tipo de cortiça é muito irregular pelo que não é utilizada para rolhas de cortiça natural. Posteriormente, por períodos de nove anos, pode extrair-se novamente a cortiça, até aos 150-200 anos do sobreiro. No entanto a matéria-prima ideal para o fabrico de rolhas de cortiça só se obtém a partir do terceiro descortiçamento.

Portugal concentra 34 % da área mundial de montado do sobreiro, o que corresponde a uma área de cerca de 716 mil hectares. Portugal é também o líder mundial do setor da cortiça relativamente à sua produção e exportação, produzindo quase 50 % da produção mundial e exportando em 2011 62 % de produtos de cortiça. Ocupa ainda o terceiro lugar nas importações de cortiça, utilizada para transformação e posterior exportação sob a forma de produtos de consumo final, com uma quota de cerca de 10 % e 134,4 milhões de euros (APCOR, 2012).

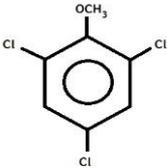
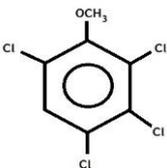
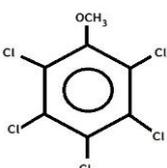
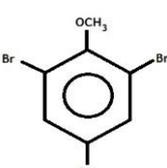
1.4 Compostos contaminantes do vinho

Desde a sua origem até à sua utilização no engarrafamento, a cortiça está exposta a diversos fatores que podem afetar negativamente a qualidade sensorial da rolha, e conseqüentemente do vinho, como é o caso da atividade microbiológica. Como resultado dessa atividade,

encontram-se compostos de aroma indesejável na cortiça, que ao migrarem para o vinho provocam alterações organoléticas do tipo mofo.

Na Tabela 1 (Coque *et al.*, 2006a) apresentam-se alguns dos compostos que já foram identificados nas rolhas de cortiça que podem contaminar o vinho, bem como o seu limite de perceção sensorial.

Tabela 1 - Compostos responsáveis pela contaminação do vinho com aroma a mofo.

| Composto | Estrutura | Limite de perceção sensorial |
|--------------------------------------|---|---|
| 2,4,6 - Tricloroanisol (TCA) |  | Em água: 30-300 pg/L Em solução alcoólica (vinho): 1,5-3 ng/L |
| 2,3,4,6 - Tetracloroanisol (TeCA) |  | Em água: 4 ng/L Em solução alcoólica (vinho): • 10-15 ng/L (vinho branco e tinto) • 5 ng/L (champanhe) |
| Pentacloroanisol (PCA) |  | Composto organoleticamente fraco > 50 µg/L |
| 2,4,6 - Tribromoanisol (TBA) |  | Em água: 8-30 pg/L Em solução alcoólica (vinho): 3,4 ng/L |

A transmissão dos compostos contaminantes para o vinho depende de fatores como:

- solubilidade dos compostos contaminantes no vinho;
- localização dos compostos contaminantes na superfície da rolha ou no seu interior;
- taxa de migração dos compostos através da matriz da cortiça;
- e volume de vinho em contacto com a rolha.

1.5 2,4,6 - Tricloroanisol (TCA)

São vários os compostos responsáveis pela contaminação de vinhos, contudo estudos realizados ao longo das duas últimas décadas atribuem este problema à presença de TCA. Um

estudo realizado por Hervé *et al.* (2004) confirmou a presença de TCA em cerca de 70-80 % dos casos de alteração organolética verificada.

Durante décadas foram utilizados clorofenóis (2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) e pentaclorofenol (PCP)) como biocidas, inseticidas e fungicidas devido às suas propriedades antimicrobianas a fim de conservarem a madeira (Sefton e Simpson, 2007). Rigaud demonstrou, em 1984, que a cortiça retirada de sobreiros tratados com estes clorofenóis (TCP, TeCP e PCP) apresentava os respetivos cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e que a sua incidência era superior nos anéis exteriores de cortiça. A maior ocorrência de TCA encontra-se na parte inferior do tronco da árvore, conferindo à cortiça, em contacto com o solo, um aroma intenso a mofo ou bolor (Sefton e Simpson, 2007).

Apesar do uso dos clorofenóis supracitados ser atualmente proibido na União Europeia, estes acumularam-se nos ecossistemas contaminando o meio envolvente (ar e solo), mantendo ativa a problemática de contaminação da cortiça com TCA. A contaminação dos ecossistemas permitiu que alguns microrganismos desenvolvessem mecanismos de defesa contra a toxicidade destes compostos. Desde então, as bactérias do solo e fungos são capazes de formar cloroanisóis através da O-metilação dos clorofenóis, que consiste na reação de biometilação do TCP, formando TCA (Coque *et al.*, 2006 a).

A maioria do TCA encontrado na rolha final já se encontrava na casca da árvore, contudo é possível a acumulação adicional de TCA na cortiça ou rolhas antes do processo de engarrafamento, através do contacto das rolhas com materiais ou atmosferas contaminados. Esta situação conduzirá a um risco acrescido de uma contaminação cruzada do vinho por rolhas que originalmente não estariam contaminadas (Sefton e Simpson, 2005). No entanto, a principal fonte de contaminação das rolhas por TCA continua a ser a da cortiça na árvore durante o seu crescimento (Sefton e Simpson, 2007).

Para que o TCA migre para o vinho, é necessário que as secções contaminadas da rolha estejam em contacto direto com o vinho ou com o *headspace* do gargalo entre a rolha e o vinho (Sefton e Simpson, 2005). Sendo o TCA um composto muito volátil, pode migrar facilmente para a fase gasosa (*headspace*) e vinho por dessorção a partir da rolha, no entanto a sua transmissão através desta é muito limitada (Pereira *et al.*, 2013).

1.6 Contributos do Trabalho

A cortiça é um produto natural, exposto a diversos fatores que podem afetar negativamente a qualidade sensorial da rolha, e consequentemente do vinho, como é o caso da atividade microbiológica. Como resultado dessa atividade, encontram-se compostos de aroma indesejável na cortiça, como é o caso do TCA, que ao migrar para o vinho provoca alterações organoléticas do tipo mofo ou bolor.

Nos últimos anos a Amorim & Irmãos, S.A. tem concentrado a sua atuação principalmente no desempenho sensorial e técnico das rolhas de cortiça. A prioridade número um do departamento de I&D, liderado pelo Prof. Doutor Miguel Cabral, baseia-se no combate ao TCA, composto responsável pelo aroma a mofo, encontrado em alguns vinhos.

Desta forma surgiu, em 2008, um projeto de desenvolvimento de um método capaz de analisar individualmente rolhas de cortiça natural sem afetar significativamente as suas propriedades físico-mecânicas. Após otimização do equipamento (Pereira, 2011 e Costa, 2012), o presente projeto estuda a possibilidade de inserção do protótipo na escala industrial de produção de rolhas, através da validação do equipamento por análise de um lote de rolhas e por avaliação do risco de contaminação destas rolhas enquanto vedantes de um vinho branco.

No fim deste projeto foram detetadas algumas limitações no equipamento, as quais estão a ser alvo de estudo por parte da parceria entre a Amorim e Irmãos, S.A. e a empresa inglesa criadora do projeto.

1.7 Organização da Tese

A presente tese encontra-se dividida em 7 capítulos.

No primeiro capítulo, é feita uma breve apresentação da Corticeira Amorim S.G.P.S., onde se insere a empresa Amorim & Irmãos, S.G.P.S., S.A., evidencia-se a importância da indústria corticeira para Portugal e introduz-se o leitor à problemática do TCA na contaminação de vinhos.

No segundo capítulo, apresenta-se a estratégia de “combate” ao TCA que inclui as técnicas e os projetos desenvolvidos ao longo dos anos para deteção, prevenção, eliminação e controlo do TCA em cortiça utilizada para produção de rolhas.

No terceiro capítulo, são descritos os equipamentos utilizados na execução deste projeto e os procedimentos experimentais seguidos.

No quarto capítulo, apresentam-se os resultados obtidos e respetiva discussão.

No quinto capítulo, são apresentadas as principais conclusões do projeto.

No sexto capítulo, referem-se os objetivos que foram concretizados neste projeto, as limitações encontradas, sugestões de trabalhos futuros e uma apreciação final do mesmo, bem como outros trabalhos realizados em paralelo.

No sétimo capítulo, para finalizar, apresentam-se todas as referências bibliográficas utilizadas no apoio à realização e compreensão deste trabalho.

2 Contexto e Estado da Arte

Durante as últimas duas décadas as empresas corticeiras desenvolveram várias estratégias de combate ao TCA, visto ser o principal composto identificado como contaminante dos vinhos. As ações implementadas assentaram em 3 aspetos: prevenção, que consiste na implementação de várias medidas que previnam a formação de TCA durante cadeia de produção de rolhas (desde a floresta até ao cliente final); descontaminação, que consiste na eliminação de TCA e outros compostos voláteis dos diferentes produtos de cortiça utilizados na produção de rolhas; e controlo da qualidade, especificamente análises cromatográficas de TCA e análises sensoriais, em várias etapas do processo produtivo (Cabral *et al.*, 2009).

Na área de prevenção verificou-se um aumento do rigor e rastreabilidade da matéria-prima, melhor arejamento da cortiça e escoamento das águas durante armazenagem, corte dos calços antes da primeira etapa do processo produtivo, monitorização das rolhas ao longo de todo o processo de produção, controlo dos tempos de estabilização entre as diferentes etapas do processo de produção, cozedura das pranchas de cortiça sem que estas estejam pressionadas reduzindo a sua humidade de 40 % para 20 % e substituição do hipoclorito de sódio utilizado na lavagem por peróxido de hidrogénio (CELIEGE, 2011; Cabral *et al.*, 2009). Estas medidas tiveram um contributo fundamental para a melhoria observada, nos últimos anos, na redução da incidência de TCA nos vinhos.

Apesar de todos os esforços, ainda não existe um tratamento 100% efetivo na remoção total de TCA da cortiça. Contudo, vários processos já foram patenteados pela empresa Amorim & Irmãos e por outras empresas do setor corticeiro, que garantem reduções de TCA significativas em produtos acabados.

O projeto Delfin (Direct Environmental Load Focused Inactivation), desenvolvido pelo Department of Phytomedicine at SLFA, Neustadt, Alemanha, com a participação da empresa portuguesa Juvenal S.A., e iniciado em 1996, apostou na remoção de TCA em rolhas de cortiça através do uso de tecnologia micro-ondas. Atualmente a empresa Juvenal S.A. utiliza o sistema Perfect[®] que combina o projeto Delfin com a desinfeção das rolhas com vapor de água desionizada. Utiliza ondas eletromagnéticas que abrem as lenticelas das rolhas possibilitando que o tratamento a vapor desinfete até ao interior do vedante, eliminando substâncias voláteis indesejáveis (TCA e outras) (Juvenal, 2013).

O grupo francês OENEO desenvolveu um método de extração de TCA de granulado de cortiça usando dióxido de carbono comprimido até ao seu estado supercrítico, isto é, onde a fase líquida e gasosa coexistem. Este processo denominado Diamant, foi iniciado em 1997 pela família Sabaté e concluído pelo grupo OENEO em 2004. Após utilização do tratamento não

foram encontrados vestígios de TCA por análise por cromatografia gasosa (GC), apresentando uma eficácia de remoção de 99,8 %. No entanto, a aplicação deste processo não pode ser efetuada em rolhas de cortiça natural, uma vez que provoca deformações físico-mecânicas nas mesmas afetando a sua capacidade de vedação em garrafa (Hibberd, 2005).

Em 2004 surgiu o sistema Symbios, um processo desenvolvido pelo Centro Tecnológico de Cortiça (CTCOR) em colaboração com empresas do setor (Sercor e Norcor). Trata-se de um processo biológico preventivo que aborda o problema durante as etapas de transformação da cortiça. Durante a fase de cozedura das pranchas este processo extrai materiais solúveis em água existentes na cortiça, como por exemplo polifenóis, com potencial impacto negativo nas bebidas com as quais entrem em contacto. Na fase de secagem após cozedura, inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejados, impossibilitando assim a formação de TCA. O CTCOR reportou que com o uso desta tecnologia se obteve uma redução de rolhas contaminadas de 1,2 % para 0,8 %. A maior limitação deste processo, tal como de outras estratégias preventivas, é o facto de não agir sobre o TCA já existente nas pranchas de cortiça (Coque *et al.*, 2006b; APCOR, 2011; APCOR, 2013).

O LNETI (Laboratório Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Portugal) desenvolveu, em 2007, uma tecnologia baseada no uso da radiação γ para destruir parcial ou totalmente o TCA, dependendo da dosagem utilizada (15-400 kGy). Este processo, segundo os autores, apresenta uma eficiência de remoção de TCA superior a 90 % (Pereira, 2007).

Desde 2007 que a linha de produção da Cork Supply conta com uma tecnologia patenteada (European Patent EP 1444 075-B1) denominada Innocork, que consiste na combinação de vapor de água, álcool etílico e temperatura controlada para volatilizar o TCA presente na estrutura celular da cortiça. A utilização de etanol beneficia a remoção de TCA por ajuste de polaridade. Destina-se apenas a rolhas naturais e a sua utilização na Cork Supply é restrita a rolhas com níveis de TCA aceitáveis, para que estes sejam praticamente nulos. A sua eficácia média é de 63 % (APCOR 2007; CorkSupply, 2013).

A empresa Amorim desenvolveu, em 1998, um processo exclusivo de lavagem hidrodinâmica de discos para rolhas técnicas, denominado INOS II. Este processo patenteado (Patente nº EP 1108507), com uma redução de TCA de 40 %, utiliza diferentes ciclos de pressão e vácuo e água quente para lavar em profundidade as lenticelas da estrutura alveolar da cortiça (Cabral *et al.*, 2012). A empresa também desenvolveu a tecnologia ROSA[®] (Rate of Optimal Steam Application) que utiliza vapor de água controlado para eliminar TCA existente no granulado de cortiça utilizado na produção de rolhas técnicas. Os ensaios laboratoriais foram iniciados em 2000 no laboratório de I&D da Amorim e Irmãos, S.A. sendo a patente (DE 60306404 T) concedida em 2006 (Cabral *et al.*, 2009). Este sistema remove 75-80 % do TCA presente inicialmente no granulado (Hall *et al.*, 2004; Sefton e Simpson, 2005). No entanto, este

processo não pode ser utilizado em rolhas de cortiça natural uma vez que sofrem deformação ao serem tratadas com vapor de água. Foi então desenvolvido o processo ROSA Evolution® (Patente nº PT 103910 A) que harmoniza tempo, temperatura e humidade para uma extração eficiente de TCA de discos e de rolhas de cortiça natural sem afetar de forma significativa as suas propriedades físico-mecânicas. Este processo apresenta uma taxa de remoção média de 82 % para discos e de 77 % para rolhas naturais; contudo, estas reduções podem variar com o nível de TCA presente inicialmente. Os processos ROSA® e ROSA Evolution® diminuem o risco de aparecimento de defeitos organoléticos no vinho, devido à presença de TCA, em 80 % a 100% (Chatonnet, 2004).

Foram desenvolvidos outros projetos de menor destaque em Espanha, pela empresa IONMED e pela Rovira I Virgili University. A empresa IONMED desenvolveu uma tecnologia baseada no uso de radiação (emissões β) para esterilizar a rolha, removendo os microrganismos que produzem TCA. Porém, este método não elimina cloroanísóis já presentes na rolha antes do tratamento. Por sua vez, a universidade referida coordenou um projeto denominado Innocuous, que efetua a lavagem de vedantes com ozono, a fim de obter a sua descontaminação.

Para confirmar a eficiência dos métodos de eliminação de TCA, é necessária a avaliação quantitativa deste composto. Assim, desenvolveu-se um sistema de controlo da qualidade com vista a analisar com precisão o nível de contaminação de TCA em cortiça nas várias etapas do processo produtivo.

Hervé *et al.* (2004) desenvolveu uma metodologia de controlo da qualidade baseada na combinação de microextração de fase sólida (SPME) com cromatografia gasosa e espetrometria de massa (GC-MS). As amostras são introduzidas no GC-MS, analisadas e quantificadas em modo SIM (single ion monitoring) permitindo um nível de sensibilidade de 1,0 ng/L. As amostras são calibradas através do uso de padrão interno deuterado (d_5 -TCA). A combinação destas técnicas criou um sistema preciso na medição de TCA. Este processo é utilizado atualmente pela A&I, sendo capaz de detetar níveis de TCA inferiores a 0,5 ng/L. O limite de rejeição do consumidor (CRT) e o limite de deteção (DT) de TCA variam com o tipo de casta, espécie de vinho e de pessoa para pessoa; contudo, um estudo realizado por Prescott *et al.* (2005) estima valores de CRT e DT de 3,1 ng/L e 2,1 ng/L, respetivamente. Diariamente a empresa A&I recebe amostras de 7 unidades industriais, de uma seleção aleatória de rolhas de diferentes lotes que são maceradas durante 24 horas numa solução hidroalcoólica a 12 % (simulação do vinho). Posteriormente realiza-se a análise dessa solução por SPME seguida de análise GC com deteção por captura eletrónica (ECD) ou por espetrometria de massa (MS). Trata-se de uma técnica baseada na quantificação do TCA

extraível na qual as rolhas desorvem TCA para uma solução hidroalcoólica, atingindo-se o equilíbrio ao fim de 24 horas (Hervé *et al.*, 2004).

No entanto os métodos de controlo da qualidade referidos baseiam-se numa amostragem aleatória de cada lote. Considerando a quantidade de rolhas produzidas diariamente numa empresa e sendo a ocorrência de TCA incerta e totalmente aleatória, a amostragem realizada aos lotes poderá não refletir a verdadeira contaminação dos mesmos. Além disso, a análise através da maceração de 10 ou 50 rolhas leva a um enviesamento do resultado final, uma vez que esta será o resultado da cinética de desorção-absorção de todas as rolhas numa mesma maceração.

Face ao exposto no parágrafo anterior e às limitações dos processos curativos (impossibilidade de eliminar totalmente o TCA em rolhas de cortiça natural sem afetar as suas propriedades físico-mecânicas), a Amorim & Irmãos, S.A., iniciou em 2008 um projeto para desenvolvimento de um equipamento capaz de detetar TCA individualmente durante o processo de produção. Numa primeira fase procedeu-se ao desenvolvimento, em parceria com uma empresa inglesa, de um protótipo de detecção individual de TCA por cromatografia gasosa com um sistema de incubação de rolhas substituindo o injetor. Os estudos desenvolvidos nessa fase inicial serviram para testar a viabilidade do método de detecção individual de TCA por cromatografia gasosa, que consiste na extração de TCA por aquecimento da rolha natural e na utilização de azoto como gás de arraste. A fase seguinte incidiu no desenvolvimento de um piloto industrial, o qual foi alvo investigação em duas dissertações de mestrado (Pereira, 2012 e Costa, 2012). Ambas as dissertações visaram a otimização do equipamento possibilitando o seu funcionamento autónomo, com eficiências de detecção de TCA para gamas de rolhas com concentração acima de 2 e 5 ng/L de 96 % e 100 %, respetivamente. Neste equipamento existem 48 câmaras de incubação, um cromatógrafo composto por 8 colunas cromatográficas, alimentação automática e detecção controlada por *software*. O presente trabalho estuda a possibilidade de inserção do protótipo na escala industrial de produção de rolhas, através da validação do equipamento por análise de um lote de rolhas e por avaliação do risco de contaminação destas rolhas enquanto vedantes de um vinho branco.

3 Descrição Técnica

Neste capítulo são descritos os equipamentos de análise utilizados bem como os protocolos de análise e modo operativo dos mesmos.

Analisando um lote de 40 000 rolhas de cortiça natural 45 mm x 24 mm classe Extra foi validado o equipamento de deteção individual, designado por MDI. Trata-se de um equipamento protótipo de deteção direta e individual de TCA em rolhas de cortiça natural. Selecionaram-se 500 rolhas (250 consideradas positivas e 250 consideradas sem TCA, pela MDI) para serem engarrafadas. O protocolo delineado foi a análise sensorial e a análise pelo método combinado de microextração de fase sólida (SPME) com cromatografia gasosa e espetrometria de massa (GC-MS) após 1, 2, 6, 12 e 24 meses do engarrafamento.

3.1 Validação do equipamento de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural

3.1.1 Deteção individual de TCA

A máquina de deteção individual de TCA (MDI) tem por base um sistema de análise GC-ECD no qual o detetor identifica compostos com elementos eletronegativos. Cada rolha em análise é colocada mecanicamente numa câmara de incubação cilíndrica e aquecida o suficiente para permitir a volatilização do TCA durante a incubação. A amostra é injetada num cromatógrafo personalizado utilizando azoto como gás de arraste e analisada de forma automática e computadorizada.

Para validação da MDI, procedeu-se à maceração e análise pelo método combinado de microextração de fase sólida por exposição no headspace (SPME) com cromatografia gasosa e deteção por captura eletrónica (GC-ECD) de uma seleção de rolhas.

3.1.2 Descrição do equipamento

Podem ser distinguidas quatro partes na composição do equipamento de deteção individual de TCA: alimentação, incubação, análise cromatográfica e segregação.

A alimentação ao sistema (Figura 1 a) é feita recorrendo ao uso de um elevador que assegura o transporte das rolhas até ao canal de alimentação. O canal de alimentação está equipado com sensores que detetam a presença ou ausência de rolhas, regulando a ação do elevador, e controlam a entrada de cada rolha no incubador.

O incubador (Figura 1 b) é constituído por um prato rotativo com 48 câmaras de incubação, projetadas para rolhas *standard* de 45x24 mm, nas quais cada rolha permanece 10 minutos a

100 °C até ser efetuada análise da amostra. A uniformidade da temperatura interna das câmaras é assegurada através de canais independentes ramificados a partir do interior do prato, nos quais circula óleo aquecido. Em cada câmara é injetado gás de arraste, azoto, fornecido por intermédio de um gerador que separa azoto de uma corrente de ar comprimido, por um processo de adsorção por variação da pressão (PSA).

Na análise cromatográfica (Figura 1 c), a amostra flui através de um tubo revestido, “*transfer-line*”, aquecido para evitar que algum dos componentes da amostra condense durante o seu trajeto até ao cromatógrafo. O cromatógrafo é constituído por 8 colunas cromatográficas de 4 metros cada, comprimento definido para que a análise se realize em 20 segundos. Durante a fase de recolha de amostra, esta é concentrada com recurso a uma válvula diafragma, sendo posteriormente injetada para uma válvula de rotação, “*switching valve*”, que controla a coluna em que a amostra é injetada. Quando uma coluna está a ser utilizada, as restantes estão a ser limpas e regeneradas através da passagem de azoto com 99,95 % de pureza, fornecido por um gerador diferente daquele que fornece o gás de arraste às câmaras de incubação. Após passagem na coluna cromatográfica, a amostra segue para outra válvula de rotação responsável pela sua passagem para o detetor. A análise é automática e processada por computador no *software* Amorim Clean Cork.

Após análise, as rolhas são segregadas para um corredor de saída (Figura 1 d) onde, consoante o resultado obtido pelo *software*, são separadas automaticamente em gamas de concentração de TCA definidas previamente pelo utilizador.



Figura 1 - Máquina de deteção individual de TCA. Constituída por: a) alimentação; b) incubação; c) análise cromatográfica e d) segregação.

Outras especificações deste equipamento, como temperaturas e tempos de referência e o tipo de colunas, encontram-se no anexo 1.

3.1.3 Modo operatório

Um lote de 40 000 rolhas de Cortiça Natural 45 mm x 24 mm classe Extra foi analisado na Máquina de Deteção Individual de TCA, na qual foram separadas as rolhas positivas (concentração de TCA superior a 5 ng/L) das rolhas negativas (concentração de TCA inferior a 5 ng/L).

Numa primeira fase (antes de análise na MDI) foi feita a caracterização do lote de rolhas através da realização de análise de TCA, pelo método SPME-GC-ECD, em 6 *soaks* de 10 rolhas cada e 800 rolhas individuais.

Após a análise da totalidade das rolhas na MDI, o lote foi validado em termos de TCA, através da realização de análise pelo método SPME-GC-ECD, em 800 rolhas que foram consideradas pela máquina como isentas de TCA (“negativas”). Além disso, todas as rolhas excluídas pela MDI foram também analisadas, individualmente, pelo método SPME-GC-ECD. A descrição e modo operatório do equipamento de análise por SPME-GC-ECD encontram-se no anexo 2.

3.2 Engarrafamento

Foram engarrafadas 500 rolhas, 250 consideradas positivas e 250 consideradas negativas, na empresa Vinícola de Nelas.

O protocolo delineado foi a análise sensorial e a análise através do método combinado de microextração de fase sólida (SPME) com cromatografia gasosa e espetrometria de massa (GC-MS) após 1, 2, 6, 12 e 24 meses do engarrafamento.

O objetivo deste ensaio foi verificar a eficácia do equipamento de deteção individual de TCA em termos de riscos de contaminação para o vinho. Isto é, pretendeu-se estudar se todas as rolhas que a máquina de deteção individual de TCA detetou como positivas contaminaram efetivamente os vinhos ou, por outro lado, se aquelas consideradas negativas realmente não contaminaram os vinhos.

3.2.1 Modo operatório

Selecionaram-se para o ensaio de engarrafamento 250 rolhas negativas e 250 rolhas positivas. A distinção destas rolhas fez-se apenas por análise individual de TCA na MDI, não tendo havido qualquer tipo de controlo por maceração individual ou conjunta para quantificação de TCA.

O engarrafamento das 500 garrafas foi realizado na Vinícola de Nelas no dia 22 de Novembro de 2013. O vinho utilizado foi Vinho Branco Mesa com título alcoométrico volúmico 12,1 % (v/v) e as garrafas foram do tipo borgonha com capacidade para 750 mL, com nível de enchimento de cerca de 63 mm a partir da entrada do gargalo.

O engarrafamento foi efetuado de forma automática, em linha; primeiro encheu-se a garrafa com o vinho, de seguida injetou-se azoto para reduzir a quantidade de oxigénio no *headspace*, sendo por fim colocada a rolha. O processo de engarrafamento encontra-se representado na Figura 2.



Figura 2 - Linha de engarrafamento.

Após engarrafamento, as garrafas permaneceram em posição vertical durante 2 a 5 dias a fim de estabilizarem e não afetar a capacidade de recuperação diametral das rolhas de cortiça. Posteriormente foram armazenadas em posição horizontal permitindo assim o contacto do vinho com a rolha para simular a situação mais frequente de armazenamento de vinhos.

No presente trabalho foram efetuados os dois primeiros pontos de análise (após 1 e 2 meses). Em cada ponto de análise foram abertas 50 garrafas com rolhas negativas e 50 garrafas com rolhas positivas, o vinho foi analisado sensorialmente e por SPME-GC-MS.

Em cada ponto de análise as garrafas foram numeradas de 1 a 100, aleatoriamente, e a mesma numeração foi aplicada nos *vials* e nos copos de análise sensorial.

Para análise sensorial verteram-se aproximadamente 50 mL de vinho para cada copo correspondente, devidamente identificados e tapados para maior conservação de aromas. A análise sensorial descritiva foi realizada de forma cega, isto é, os provadores não foram informados acerca do objetivo da prova para que não desenvolvessem uma predisposição especial para o TCA; embora outros desvios sensoriais detetados (como por exemplo: podre, metálico ou erva) não tenham sido contabilizados para o estudo. Cada provador recebeu uma folha com uma tabela onde à frente de cada número identificavam a alteração organolética detetada. Esses dados foram tratados estatisticamente para verificar se o vinho se considerava contaminado (deteção por parte de mais de 50% dos provadores).

Posteriormente efetuou-se a análise por SMPE-GC-MS, cuja descrição e modo operatório se encontram no anexo 3. Efetuou-se uma repetibilidade da análise de cada vinho. A quantidade de TCA considerada para resultados foi a média das duas análises.

4 Discussão de Resultados

4.1 Validação do equipamento de deteção individual de TCA

Como ponto de amostragem inicial foram seleccionadas 60 rolhas para maceração composta, aleatoriamente, antes de passarem na Máquina de Deteção Individual de TCA, para análise por SPME-GC-ECD. Após análise dos 6 *soaks* de 10 rolhas cada verificou-se que 5 deles apresentavam valores de TCA inferiores ao limite de quantificação (0,5 ng/L) do método analítico SPME-GC-ECD (< lq), como se mostra na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da maceração conjunta de 60 rolhas (6 *soaks* de 10 rolhas cada).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|-----|------|------|------|------|------|
| TCA (ng/L) | 3,5 | < lq |

O conhecimento prévio do lote utilizado indicava que este possuía uma elevada incidência de TCA; contudo os resultados obtidos em termos de análise de TCA em *soaks* não suportaram essa avaliação prévia, provando uma vez mais que a análise de uma pequena amostragem de um lote de rolhas de cortiça natural pode não traduzir a realidade do lote.

Para uma melhor caracterização deste lote foi efetuada uma análise adicional de TCA em 800 rolhas retiradas diretamente do lote, isto é, sem passarem na MDI (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização do lote por análise de TCA (SPME-GC-ECD) em rolhas antes da MDI.

| Gama TCA (ng/L) | < lq | [0,5-2[| [2-5[| [5-10[| [10-20[| [20-50[| [50-100[| >100 | Total |
|-----------------|--------|---------|-------|--------|---------|---------|----------|-------|-------|
| Antes da MDI | 475 | 272 | 32 | 6 | 8 | 4 | 2 | 1 | 800 |
| | 59,4 % | 34,0 % | 4,0 % | 0,8 % | 1,0 % | 0,5 % | 0,3 % | 0,1 % | |

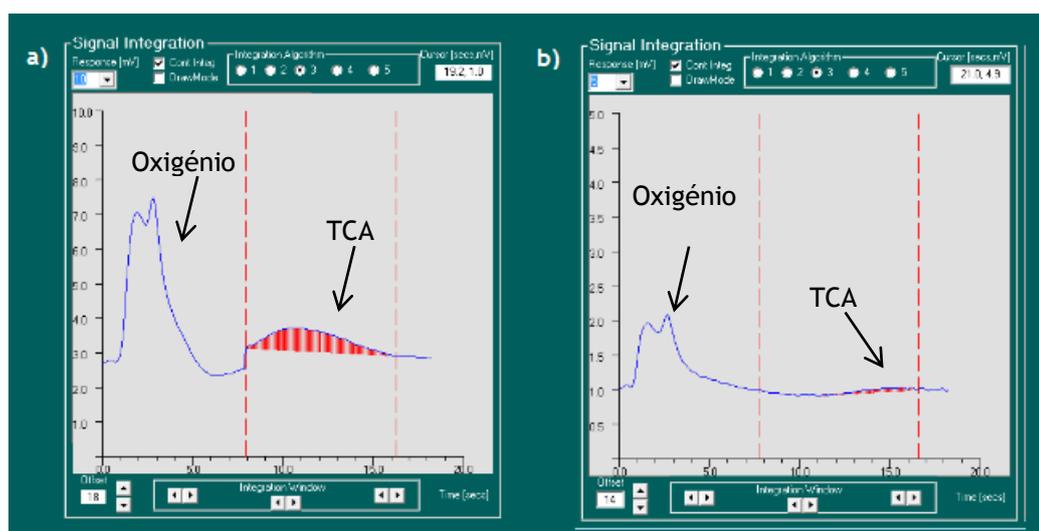
A amostragem de lote antes da MDI deu-nos informação de que 59,4 % do lote apresentava valores de TCA inferiores ao limite de quantificação, sendo então que 40,6 % das rolhas seleccionadas apresentavam contaminação. Observa-se que 6,7 % da amostragem apresentava valores superiores a 2 ng/L, dos quais 2,7 % se referem a valores superiores a 5 ng/L.

Após análise total do lote na MDI, foram seleccionadas 800 rolhas consideradas negativas e a totalidade das rolhas positivas, rejeitadas pela máquina. O objetivo destas análises por SPME-GC-ECD consistiu na validação do equipamento de deteção individual de TCA (Tabela 4).

Tabela 4 - Validação da MDI por análise de TCA em 800 rolhas negativas e todas as rolhas positivas.

| Gama TCA (ng/L) | < lq | [0,5-2[| [2-5[| [5-10[| [10-20[| [20-50[| [50-100[| >100 | Total |
|------------------|--------|---------|-------|--------|---------|---------|----------|-------|-------|
| Negativas | 550 | 227 | 13 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 800 |
| | 68,8 % | 28,4 % | 1,6 % | 0,9 % | 0,4 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | |
| Positivas | 423 | 163 | 21 | 58 | 93 | 125 | 78 | 59 | 1020 |
| | 41,5 % | 16,0 % | 2,1 % | 5,7 % | 9,1 % | 12,3 % | 7,6 % | 5,8 % | |

As 800 rolhas negativas, aprovadas pela máquina, apresentavam 31,3 % de rolhas contaminadas (acima de 0,5 ng/L). Estes resultados mostram que cerca de 70 % das rolhas aprovadas pela MDI apresentavam valores de TCA abaixo do limite de quantificação do método laboratorial (SPME-GC-ECD), isto é, rolhas que não terão potencial de contaminação do vinho. Das rolhas aprovadas, 30 % apresentavam TCA entre 0,5 e 5 ng/L, o que confirma os resultados da otimização do equipamento de MDI, em que se mostrou que este não é 100 % eficaz na segregação de rolhas nesta gama de TCA. Esta limitação está relacionada com as características intrínsecas do equipamento e está neste momento a ser alvo de estudo para que o próximo equipamento seja mais sensível nesta gama de TCA. No entanto observou-se que 1,3 % das rolhas aprovadas possuía TCA acima de 5 ng/L. Tal resultado foi surpreendente numa primeira fase; contudo, após uma análise aprofundada do sistema, verificou-se que este problema se deveu ao funcionamento contínuo da máquina, durante 24 h/dia, e à descida de temperatura verificada durante a noite, deslocando o pico de TCA para uma zona não abrangida pela janela de integração, tornando assim o TCA invisível para o sistema (Figura 3).

Figura 3 - Cromatograma de um pico de TCA integrado com a) $T_{\text{coluna}} = 110^{\circ}\text{C}$ e b) $T_{\text{coluna}} = 96^{\circ}\text{C}$.

No total das 40 mil rolhas, a MDI rejeitou 1020 rolhas, o que dá uma rejeição de 2,6 %. Pode observar-se que 41,5 % das rolhas positivas apresentavam TCA inferior ao limite de quantificação, sendo estes valores “falsos positivos”. Como se pode ver na Figura 4, existe

uma depressão que influencia a integração do *software* como sendo TCA, no entanto não se trata desse composto.

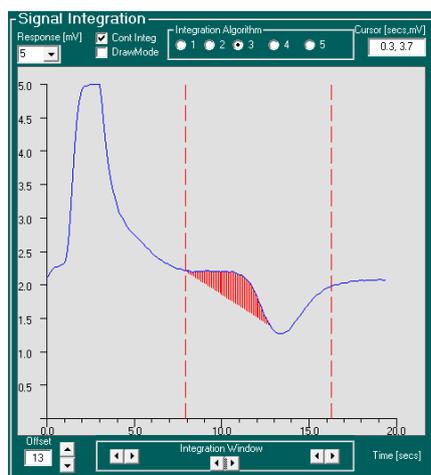


Figura 4 - Cromatograma de um falso positivo integrado pelo *software*.

Com vista a resolver este problema nas rolhas selecionadas para engarrafamento, foi utilizado outro método de integração do *software*, ainda em fase de experimentação, que elimina os falsos positivos, contudo o cromatograma exige monitorização contínua para evitar que também o TCA não seja integrado e aceite pela máquina.

Verifica-se que 18,1 % das rolhas rejeitadas apresentavam valores entre 0,5 e 5 ng/L; porém, a grande maioria (40,5 %) apresentava concentrações de TCA acima de 5 ng/L. Este tipo de resultados está de acordo com o desempenho da MDI que é superior na deteção de rolhas com TCA acima de 5 ng/L do que rolhas abaixo deste valor.

Estes resultados demonstram que uma percentagem significativa das rolhas com valores de TCA entre 0,5 e 5 ng/L não foram detetadas pela MDI. Existe ainda uma percentagem, embora pequena, de rolhas não detetadas pela MDI com TCA superior a 5 ng/L. A causa deste problema foi identificada, pelo que se estão a estudar melhores formas de isolar termicamente o forno para que a variabilidade de temperatura seja mínima e desta forma o tempo de retenção do pico de TCA seja estável.

4.3 Análise do vinho após diferentes períodos de engarrafamento

Em cada ponto de análise foram abertas 50 garrafas vedadas com rolhas negativas, aceites pela MDI, e 50 garrafas vedadas com rolhas positivas. O vinho foi analisado sensorialmente e por SPME-GC-MS. Como referido anteriormente, os provadores não foram informados acerca do objetivo da prova para que não desenvolvessem uma predisposição especial para o TCA; contudo não foram contabilizados outros desvios sensoriais detetados. Para tratamento de dados agruparam-se as rolhas em positivas e negativas.

4.3.1 Após 1 mês de engarrafamento

Neste primeiro ponto de análise a prova sensorial foi efetuada por 8 provadores do painel de provadores da Amorim & Irmãos. A tabela dos resultados obtidos na análise sensorial e na análise por SPME-GC-MS para os vinhos vedados com rolhas positivas e com rolhas negativas são apresentados em Anexo (Anexos 4 e 5, respetivamente),

A Figura 5 mostra a representação gráfica dos resultados obtidos por SPME-GC-MS bem como o limite de quantificação do equipamento, sendo que as barras distinguidas com padrão se referem aos vinhos com alteração organolética detetada por mais de 50 % dos provadores, ou seja, vinhos considerados sensorialmente contaminados.

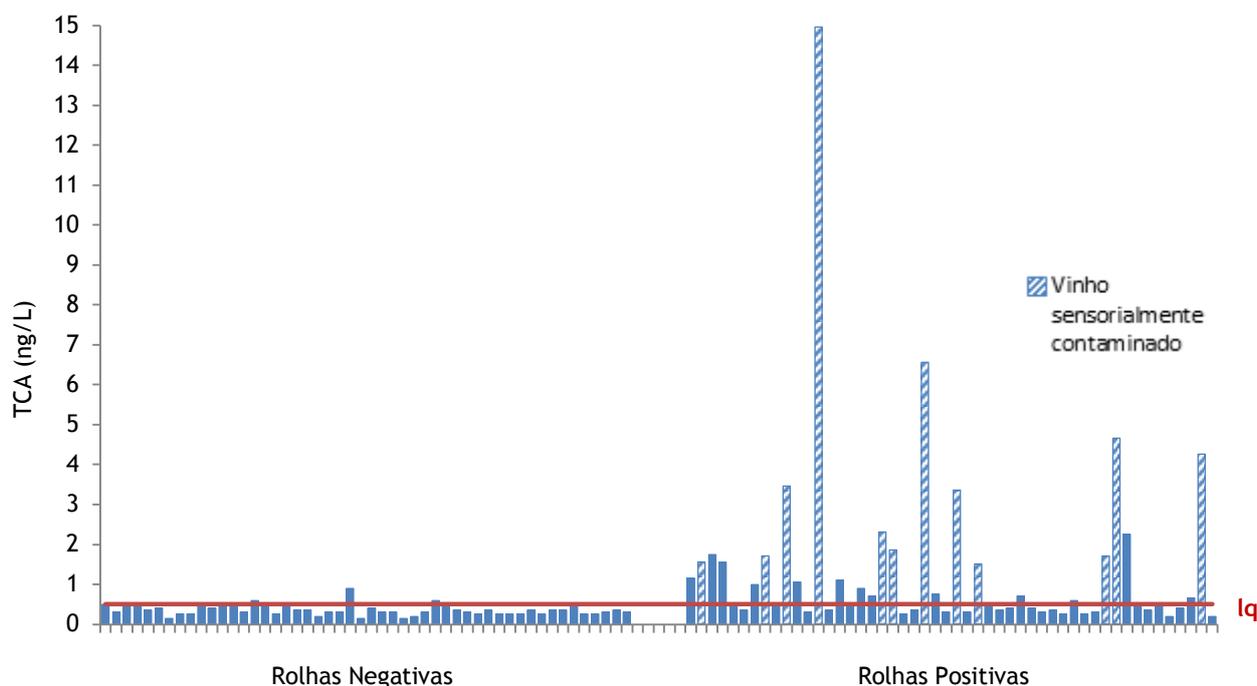


Figura 5 - Concentração de TCA nos vinhos analisados após 1 mês de engarrafamento.

Verifica-se que dos vinhos vedados com rolhas negativas, após um mês de engarrafamento, apenas 3 apresentavam TCA superior ao limite de quantificação, no entanto esses valores eram inferiores a 1 ng/L. A existência de tais valores explica-se pela já referidas limitações

inferiores a 1 ng/L. O engarrafamento das 50 rolhas positivas deste ponto de análise resultou na contaminação de 22 vinhos (TCA superior a 0,5 ng/L), dos quais 12 foram considerados sensorialmente contaminados e 10 desses apresentavam valor de TCA superior ao DT. Os restantes 2 vinhos contaminados sensorialmente apresentavam TCA de 1 e 1,3 ng/L, deduzindo-se que nestes casos as características do vinho em estudo salientaram o aroma a TCA, apesar dos seus valores relativamente baixos, ou existia outro composto predominante responsável pelo aroma a mofo identificado pelos provadores como sendo TCA. Apesar disso, 3 vinhos com contaminação de TCA de cerca de 1,6 ng/L não foram detetados pelos provadores, facto já explicado nos resultados após 1 mês de engarrafamento.

Efetuuou-se uma análise à possível correlação de TCA na rolha *versus* TCA no vinho neste segundo ponto de análise (Figura 7 e Figura 8).

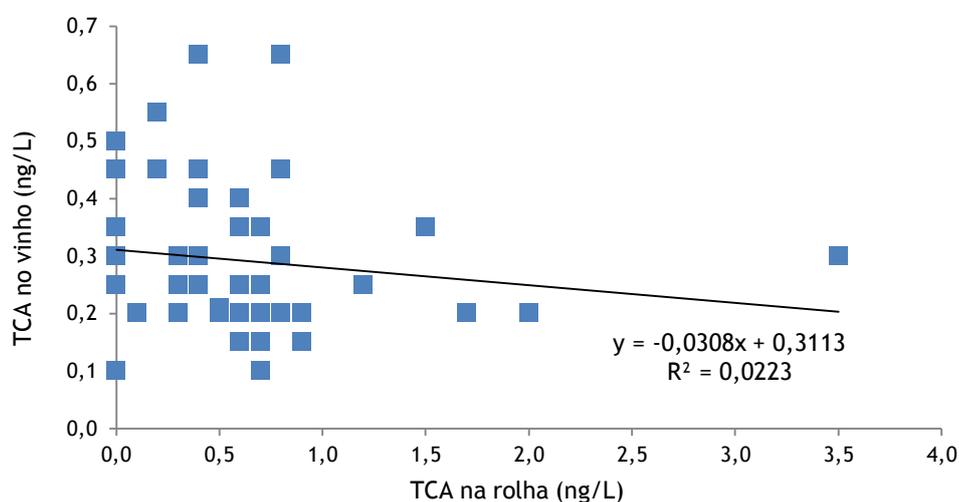


Figura 7 - Estudo da correlação de TCA: rolha negativas *versus* vinho após 2 meses de engarrafamento.

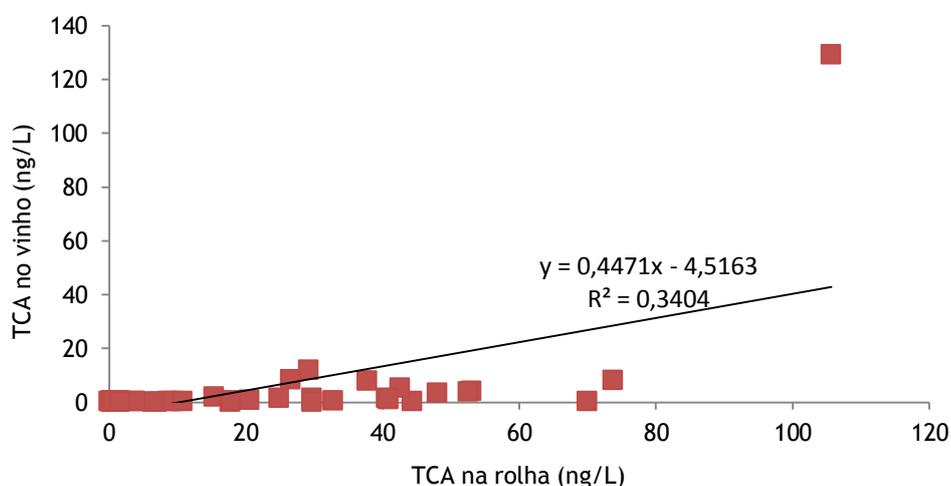


Figura 8 - Estudo da correlação de TCA: rolha positivas *versus* vinho após 2 meses de engarrafamento.

Esta análise permitiu concluir que neste caso não existe uma correlação entre o TCA nas rolhas e o TCA nos vinhos. Durante o armazenamento em garrafa, o vinho estava em contacto com uma pequena parte da rolha, sendo o *headspace* entre a rolha e o vinho nulo. Para análise das rolhas foi efetuada maceração parcial das mesmas, sendo que a superfície anteriormente em contacto com o vinho se encontrava mergulhada na solução hidroalcoólica. Nesta maceração há possibilidade de migração de TCA para a solução através do *headspace* húmido, influenciando assim os níveis de TCA “na rolha”.

A Tabela 5 apresenta as gamas de TCA obtidas nos vinhos analisados após 1 e 2 meses de engarrafamento com as rolhas consideradas negativas e positivas pela MDI.

Tabela 5 - Gamas de TCA obtidas nos vinhos após os dois meses de engarrafamento.

| | | Gama de TCA (ng/L) | < nq | [0,5-1[| [1-2[| [2-5[| > 5 |
|---------|-----------|-----------------------|------|---------|-------|-------|-----|
| 1 mês | Negativas | | 42 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | % | | 84% | 16% | 0% | 0% | 0% |
| | Positivas | | 24 | 7 | 11 | 6 | 2 |
| | % | | 48% | 14% | 22% | 12% | 4% |
| 2 meses | Negativas | | 46 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | % | | 92% | 8% | 0% | 0% | 0% |
| | Positivas | | 28 | 7 | 5 | 4 | 6 |
| | % | | 56% | 14% | 10% | 8% | 12% |

Para as rolhas negativas, verificou-se que após 1 e 2 meses de engarrafamento não houve contaminação de vinhos com TCA acima de 1 ng/L. A gama de contaminação de vinhos por TCA entre 0,5 a 1 ng/L apresentou menor percentagem após o segundo mês.

No caso das rolhas positivas, após o segundo mês de engarrafamento observou-se percentagem ligeiramente superior de vinhos com TCA inferior ao limite de quantificação. Também neste mês se obteve maior número de vinhos com TCA superior a 5 ng/L, ou seja, com maior contaminação.

5 Conclusões

A validação do equipamento de deteção individual de TCA (MDI) foi efetuada por análise de um lote de 40 mil rolhas. Uma percentagem significativa das rolhas com valores de TCA entre 0,5 e 5 ng/L não são detetadas pela MDI, estando a ser estudadas formas de aumentar a eficiência nesta gama de TCA no novo equipamento de deteção individual. A percentagem de rolhas não detetadas pela MDI com TCA superior a 5 ng/L deve-se às oscilações da temperatura do forno das colunas que fazem variar o tempo de retenção do pico de TCA que é integrado pelo *software*.

A eficácia da MDI em termos de riscos de contaminação para o vinho foi efetuada recorrendo à análise sensorial e química (por SPME-GC-MS) de vinho engarrafado após diferentes períodos de tempo. Após 1 e 2 meses de engarrafamento, verificou-se que os vinhos engarrafados com rolhas aceites pela MDI, não se encontravam contaminados de forma significativa e perceptível sensorialmente. Cerca de metade dos vinhos vedados com rolhas positivas, rejeitadas pela MDI, encontravam-se contaminados em ambos os pontos de análise. Destes, apenas 50% se encontravam organoleticamente alterados de forma a serem detetados por mais de metade dos provadores.

Com as melhorias referidas e já em fase avançada de desenvolvimento, a deteção individual de TCA por volatilização térmica deste composto permitirá à indústria rolheira um aumento da qualidade do produto produzido. A introdução deste método de deteção no processo produtivo permitirá a deteção prévia da contaminação eliminando essas rolhas do sistema.

6 Avaliação do Trabalho Realizado

6.1 Objetivos Realizados

O objetivo do presente trabalho passava pelo estudo da possibilidade de inserção do protótipo na escala industrial de produção de rolhas, através da validação do equipamento por análise de um lote de rolhas e por avaliação do risco de contaminação de TCA de rolhas enquanto vedantes de um vinho branco.

O equipamento foi validado existindo ainda algumas limitações que estão a ser alvo de estudo na empresa.

O vinho foi analisado após 1 e 2 meses de engarrafamento, pelo que faltam efetuar 3 pontos de análise, não realizados devido ao curto período de duração do projeto.

A introdução do equipamento de análise individual de TCA na escala industrial de produção de rolhas mostra-se um projeto promissor.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante os cinco meses de realização de tese de mestrado na empresa Amorim & Irmãos, S.A. foram realizados em paralelo outros trabalhos, nomeadamente análises de TCA efetuadas diariamente no laboratório. Foi apoiado um pequeno estudo da eficiência do equipamento de eliminação de TCA, Rosa Evolution[®] e analisados outros lotes de rolhas na máquina de deteção individual de TCA.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

A continuidade deste projeto incide nos restantes 3 pontos de análise do vinho após 6, 12 e 24 meses de engarrafamento.

O equipamento de deteção individual de TCA trata-se de um protótipo industrial pelo que está sujeito a contínuas melhorias. Entre elas está o desenvolvimento e aprimoramento do método de integração ótimo. Existe um método que reduz o número de “falsos positivos” integrando a extremidade menor da depressão verificada nestes casos, contudo mantém o problema nos picos maiores de “falsos positivos”. Outro método existente revela-se mais eficaz na eliminação de “falsos positivos”, porém desconsidera igualmente alguns picos de TCA. A Amorim e Irmãos S.A. e a empresa inglesa parceira continuam a estudar a resolução deste problema para que a MDI possa trabalhar em contínuo e sem monitorização constante. Paralelamente estão a ser feitos progressos no isolamento térmico do forno.

Outro projeto da parceria da A&I com a mesma empresa inglesa é o desenvolvimento de uma câmara de incubação para análise de lotes de 10 rolhas. O objetivo é introduzir a análise coletiva por GC-ECD na linha de produção. As rolhas produzidas seriam analisadas termicamente em grupos de 10 rolhas e no caso de se verificar contaminação essas rolhas saíam do sistema de análise, caso contrário seguiam para o tratamento ROSA Evolution® e posterior lavagem e tratamentos de superfície.

6.4 Apreciação final

O estágio desenvolvido foi uma mais-valia no meu percurso académico, permitindo-me um primeiro contacto bastante positivo com o ambiente empresarial. A oportunidade de integrar uma equipa dinâmica e versátil enriqueceu-me académica e pessoalmente. Foi também importante conhecer a indústria corticeira desde o tratamento da matéria-prima até à realização do produto final.

7 Referências

- Amorim Homepage : <http://www.amorim.com/home.php> [acedido a 23 de Setembro de 2013]
- AmorimCork (online) <http://www.amorimcork.com/natural-cork/cork-and-other-applications/> [acedido a 17 de Janeiro de 2014]
- APCOR 2007. *A new technology for volatiles reduction on natural cork stoppers: INNOCORK process* (Online) http://apcor.pt/userfiles/File/INNOCORK_E_Oct_07.pdf [acedido a 11 de Novembro de 2013]
- APCOR 2011. *O combate ao 2,4,6-tricloroanisol (TCA)*, Manual técnico de rolhas, 19-26 (Online) http://www.apcor.pt/userfiles/File/Publicacoes/Manual_Rolhas_PT.pdf [acedido a 19 de Novembro de 2013]
- APCOR 2012. *Anuário APCOR 2012*, 20-37.
- APCOR 2013 Homepage: <http://apcor.pt/> [acedido a 5 de Novembro de 2013]
- Cabral, M., Roseira, I., Lopes, P. (2009) *Amorim: un caso de suceso en la lucha contra el TCA*, Revista Enología nº3 Año VI Mayo-Junio 2009, 26-28.
- Cabral, M., Lopes, P., Roseira, I. (2012) *The case of cork*. Em *Distilled Spirits - Science and Sustainability*. Proceedings of the Worldwide Distilled Spirits Conference; Walker, G., Fotheringham, R., Goodall, I., Murray, D. (editors) British Library Cataloguing in Publication Data/Nottingham University Press : Nottingham, 2012, 27-33.
- CELIEGE (2011) *Código Internacional das Práticas Rolheiras versão 6.0*, CELIEGE European Cork Federation (Online) http://www.celiege.com/Ingles/systecode/international_code/CIPR2011%20PORTUGUES.pdf [acedido a 22 de Outubro de 2013]
- Chatonnet, P. (2004) *Etude de la réduction de la teneur en 2,4,6-trichloroanisole présent dans le liège par un système d'entraînement continu à la vapeur*, Revue Française d'Oenologie, 209, 22-26.
- Coque, J.J.R., Rodríguez, M.L.A., Goswami, M., Martínez, R.F. (2006a) *Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles)*, INBIOTEC, ASECOR, Espanha, 7 - 26.
- Coque, J. J. R., Pérez, E. R., Goswami, M., Martínez, R. F., Garcia, S. C., Rodríguez, M. L. A., Martin, J.F. (2006b) *Wine Contamination by Haloanisoles:*

Towards the development of biotechnological strategies to remove chloroanisoles from cork stoppers, INBIOTEC, APCOR, 36-40.

- **CorkSupply** Homepage: <http://www.corksupply.com/commitment-quality/innocork.aspx> [acedido a 11 de novembro de 2013]
- **Costa, C. (2012)** *Otimização de equipamento industrial para a quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- **Fortes, M.A., Rosa, M.E., Pereira, H. (2004)** *A Cortiça*, Instituto Superior Técnico, 12-17, Portugal.
- **Hall, M., Byrd, N., Williams, J. (2004)** *An assessment of the effect of the ROSA treatment on the level of TCA in naturally-contaminated cork granules*, The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker, 57-59.
- **Hervé, E., Price, S., Burns, G. e Weber, P. (2004)** *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork*, ETS Laboratories.
- **Hibberd, J. (2005)** *A new state of cork, do we care a Diam?*, Herpers supplement: closures, 22-24, (Online) <http://www.oeneo.co.uk/pdfs/Credentials/Press/DIAMDE%5B3%5D.pdf> [acedido a 15 de outubro de 2013]
- **Juvenal** Homepage: <http://www.juvenalcork.com/> [acedido a 11 de novembro de 2013]
- **Lino, J. M. (2008)** *Migração de d₅-TCA através de vedantes em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- **Pereira, B., Lopes, P., Marques, J., Piementa, M., Alves, C., Roseira, I., Mendes, A., Cabral, M. (2013)** *Sealing effectiveness of diferente types of closures towards volatile phenols and haloanisoles*, Journal international des sciences de la vigne et du vin (Bordeaux, France), 2013, 47, n°2, 145-157.
- **Pereira, C., Gil, L., Carriço, L. (2007)** *Reduction of the 2,4,6-trichloroanisole content in cork stoppers using gamma radiation*, Radiation Physics and Chemistry, Vol. 76, 4ª Edição, 729-732.
- **Pereira, P. (2012)** *Novos métodos rápidos para a quantificação de 2,4,6 - Tricloroanisol*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- **Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., Kim, S. (2005)** *Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine*, Food Quality and Preference 16, 345-349.

- **Sefton, M.A. e Simpson, R.F. (2005)** *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 226-240.
- **Sefton, M.A. e Simpson, R.F. (2007)** *Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in cork bark and wine corks*. Australian Journal of Grape and Wine Research 13, 106-116.

Anexo 1 Especificações do equipamento de detecção individual de TCA

Temperatura do injetor: 120 °C

Temperatura das colunas cromatográficas: 110 °C

Temperatura do detetor: 200 °C

Dimensão das câmaras de incubação: 54 mm de altura × 28 mm de diâmetro

Tempo de incubação: 10 min

Tempo de análise: 20 s

Colunas cromatográficas: 8 colunas Phenomenex Zebron MXT-5 HT (high temperature); 4,5 m de comprimento × 0,18 mm de diâmetro × 0,2 µm de espessura

Detetor: ECD 370 MBq Ni63

Gás de arraste: Azoto com 99,995% de pureza

Caudal injetado: 30 mL/min

Medidor de caudal: CSI 6000, 0-500 mL/min +- 0,2 mL N₂

Anexo 2 Análise por SPME-GC-ECD para confirmação de resultados

Descrição do equipamento

No equipamento de análise SPME-GC-ECD podem ser distinguidas 2 partes, o *autosampler*, responsável pelo tratamento da amostra até ao cromatógrafo, e o cromatógrafo, onde a amostra é analisada.

O *autosampler* (Figura A2.1 a) é constituído por um suporte de 2 *trays* onde são colocados os tubos cromatográficos com as respetivas amostras; um braço mecânico responsável pelo transporte da amostra do *tray* para a incubadora e novamente para o *tray*, com uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm que é exposta ao *headspace* extraíndo os compostos voláteis.

O cromatógrafo (Figura A2.1b) possui um injetor, onde a fibra dissolve termicamente os compostos; uma coluna cromatográfica de fraca polaridade, com uma rampa de temperatura de 90 °C no instante inicial aumentando gradualmente 15 °C/min até se atingirem os 265 °C; e um detetor de captura eletrónica.

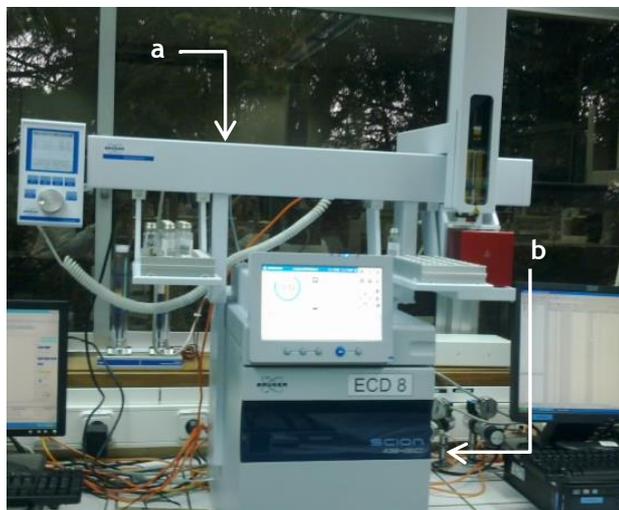


Figura A2.1 - Equipamento de análise por SPME-GC-ECD: a) autosampler e b) cromatógrafo

Modo operativo

Para a maceração composta (*soaks*) são colocadas 10 rolhas num frasco de 500 mL e para maceração individual cada rolha é colocada num frasco de 60 mL, posteriormente o volume é perfeito com solução hidroalcoólica a 12 % (v/v), repousando por 24h.

Após este período são retiradas as rolhas, pipetam-se 10 mL da solução para um tubo de cromatografia (*vial*) de 20 mL com aproximadamente 3 g de cloreto de sódio, adicionam-se

100 µL de padrão interno e por fim o *vial* é selado com uma cápsula metálica com um septo de silicone. O cloreto de sódio tem como objetivo auxiliar a volatilização do TCA para o *headspace* possibilitando assim a sua extração. Por sua vez o padrão interno serve de referência para análise do espectro obtido, uma vez que o método do padrão interno relaciona a razão entre a área do pico de TCA na amostra e a área do pico do padrão interno com concentração de 20 ng/L. No caso da cromatografia gasosa por captura eletrónica o padrão interno utilizado é o 2,3,6-tricloroanisol, representado na Figura A2.2, que apresenta carga iónica inferior ao 2,4,6-tricloroanisol tendo menor tempo de retenção.

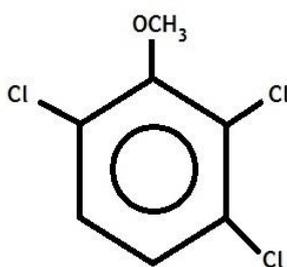


Figura A2.2 - Padrão interno: 2,3,6-tricloroanisol.

Os *vials* são colocados no suporte automático (*tray*) do GC-ECD para se proceder à análise de cada amostra.

Após uma pré-incubação do *vial* durante 2 minutos, a fibra é exposta ao *headspace* deste durante 8 minutos, a 50 °C, com agitação a fim de provocar a extração. Os compostos voláteis são depois dessorvidos termicamente da fibra para o injetor do cromatógrafo que se encontra a 270 °C. A fibra permanece no injetor durante 4 minutos, em modo *splitless*, fechando a válvula após 2 min. No instante em que se inicia a dessorção, os compostos iniciam a sua passagem na coluna, onde é feita a separação cromatográfica. A cada grupo de 31 ensaios é analisado um padrão de controlo (padrão com concentração pré-conhecida de 2 ng/L).

Especificações

Coluna: fraca polaridade DR5-MS composta de sílica capilar. Dimensões: 30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro × 0,25 µm de espessura

Tempo de estabilização: 30 s

Temperatura do injetor: 270 °C

Fluxo de gás na coluna: 1,0 mL/min

Gás de arraste: He₂ com alta pureza

Gás de limpeza: N₂ com alta pureza

Anexo 3 Análise dos vinhos por SPME-GC-MS

Descrição do equipamento

O equipamento de análise SPME-GC-MS, Figura A3.1, difere do equipamento de análise SPME-GC-ECD (anexo 2) no detetor, espectroscopia de massa e exterior ao cromatógrafo, e não utiliza azoto, sendo a limpeza efetuada com hélio.

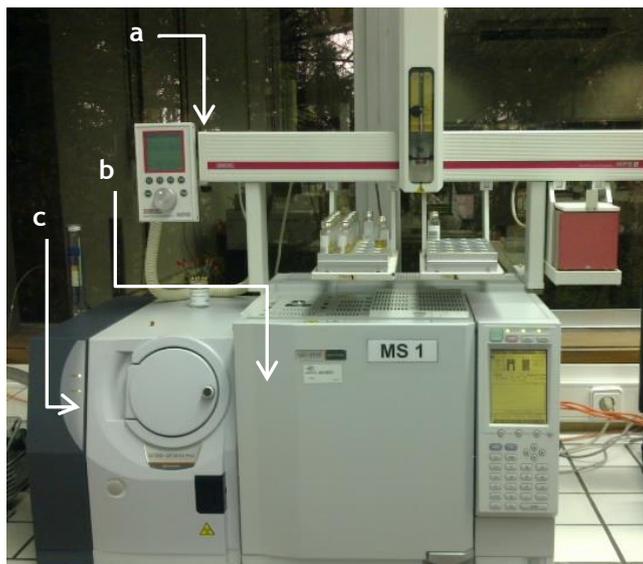


Figura A3.1 - Equipamento de análise por SPME-GC-MS: a) autosampler b) cromatógrafo c) detetor.

Modo operatório

Pipetam-se 10 mL de vinho para um tubo de cromatografia (*vial*) de 20 mL com aproximadamente 3 g de cloreto de sódio, adicionam-se 100 μ L de padrão interno e por fim o *vial* é selado com uma cápsula metálica com um septo de silicone. O cloreto de sódio tem como objetivo auxiliar a volatilização do TCA para o *headspace* possibilitando assim a sua extração. Por sua vez o padrão interno serve de referência para análise do espectro obtido, uma vez que o método do padrão interno relaciona a razão entre a área do pico de TCA na amostra e a área do pico do padrão interno com concentração de 20 ng/L. No caso da espectroscopia de massa, como o 2,3,6-tricloroanisol apresenta a mesma massa molecular que o TCA, é necessário utilizar um padrão interno diferente, pelo que se utiliza o TCA deuterado (d_5 -TCA). No d_5 -TCA os hidrogénios da estrutura de TCA são substituídos pelo deutério, o que leva a um aumento da massa molecular de 5 g/mol, apresentando maior tempo de retenção.

Os *vials* são colocados no suporte automático (*tray*) do GC-MS para se proceder à análise de cada amostra.

Após uma pré-incubação do *vial* durante 2 minutos, a fibra é exposta ao *headspace* deste durante 8 minutos, a 50 °C, com agitação a fim de provocar a extração. Os compostos voláteis são depois dessorvidos termicamente da fibra para o injetor do cromatógrafo que se encontra a 270 °C. A fibra permanece no injetor durante 4 minutos, em modo *splitless*, fechando a válvula após 2 min. No instante em que se inicia a dessorção, os compostos iniciam a sua passagem na coluna, onde é feita a separação cromatográfica. A cada grupo de 31 ensaios é analisado um padrão de controlo (padrão com concentração pré-conhecida de 2 ng/L).

Especificações

Coluna: fraca polaridade DR5-MS composta de sílica capilar. Dimensões: 30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro × 0,25 µm de espessura

Tempo de estabilização: 30 s

Temperatura do injetor: 270 °C

Fluxo de gás na coluna: 1,6 mL/min

Gás de arraste e de limpeza: He₂ com alta pureza

Anexo 4 Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento (rolhas positivas)

Tabela A4.1 - Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas positivas pela MDI.

| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Provedores | | | | | | | | Provedores (%) | Resultado | |
|---------|------------------------|------------------------|-------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----------|-----|
| | | | | A | B | C | D | E | F | G | H | | | |
| 1 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | | | | | TCA | | | | | 12,5 | |
| 4 | 1,7 | 1,4 | 1,6 | | | TCA | | TCA | TCA | TCA | | | 50,0 | TCA |
| 5 | 2,2 | 1,3 | 1,8 | | TCA | | | TCA | | | | | 25,0 | |
| 7 | 1,9 | 1,2 | 1,6 | | TCA | TCA | | | | | | | 25,0 | |
| 8 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | | | TCA | | | TCA | | | | 25,0 | |
| 10 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 12 | 1,2 | 0,8 | 1,0 | | TCA | | TCA | | | | | | 25,0 | |
| 15 | 1,8 | 1,6 | 1,7 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | | | 75,0 | TCA |
| 16 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | | | | | TCA | | | TCA | | 25,0 | |
| 19 | 3,2 | 3,7 | 3,5 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | TCA | | 87,5 | TCA |
| 20 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | TCA | | | | TCA | TCA | | | | 37,5 | |
| 21 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 22 | 15,8 | 14,1 | 15,0 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | | 100,0 | TCA |
| 24 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | TCA | | | TCA | | 25,0 | |
| 27 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | | | TCA | | | TCA | | | | 25,0 | |
| 28 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 31 | 1,1 | 0,7 | 0,9 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 32 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 34 | 2,4 | 2,2 | 2,3 | TCA | TCA | TCA | | TCA | | TCA | TCA | | 75,0 | TCA |
| 38 | 1,6 | 2,1 | 1,9 | TCA | TCA | | | TCA | | TCA | TCA | | 62,5 | TCA |
| 39 | 0,1 | 0,4 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 40 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | TCA | | TCA | TCA | | | | 37,5 | |
| 43 | 6,4 | 6,7 | 6,6 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | | 100,0 | TCA |

| (continuação) | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----------|-----|
| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Provadores | | | | | | | | Provadores (%) | Resultado | |
| | | | | A | B | C | D | E | F | G | H | | | |
| 44 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 46 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 49 | 3,1 | 3,6 | 3,4 | TCA | TCA | | TCA | TCA | | TCA | TCA | | 75,0 | TCA |
| 52 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 53 | 1,4 | 1,6 | 1,5 | TCA | TCA | | TCA | TCA | | TCA | | | 62,5 | TCA |
| 62 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 66 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 68 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | | | | | | TCA | | | | 12,5 | |
| 69 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 72 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 74 | 0,7 | 0,5 | 0,6 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 75 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 76 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | TCA | TCA | | TCA | | | | 37,5 | |
| 79 | 1,9 | 1,5 | 1,7 | TCA | TCA | TCA | | TCA | | TCA | | | 62,5 | TCA |
| 81 | 5,2 | 4,1 | 4,7 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | | 100,0 | TCA |
| 82 | 2,2 | 2,3 | 2,3 | | | TCA | | TCA | | | | | 25,0 | |
| 85 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | | | | | TCA | | | | | 12,5 | |
| 86 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 89 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 90 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 91 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 | |
| 94 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | TCA | | | | | | | | | 12,5 | |
| 96 | 5,0 | 3,5 | 4,3 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | | 100,0 | TCA |
| 99 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | | | | | | | | | | 0,0 | |

Anexo 5 Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento (rolhas negativas)

Tabela A5.1 - Resultados obtidos após 1 mês de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas negativas pela MDI.

| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Provedores | | | | | | | | Resultado | |
|---------|------------------------|------------------------|-------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----------|--|
| | | | | A | B | C | D | E | F | G | H | | |
| 2 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | | | | | | | | TCA | 12,5 | |
| 3 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | TCA | | TCA | | | | TCA | 37,5 | |
| 6 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | | | TCA | | TCA | TCA | | | 37,5 | |
| 9 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | | | TCA | | | TCA | | | 25,0 | |
| 11 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | | | TCA | | | | | | 12,5 | |
| 13 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 14 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | | | | | TCA | | | | 12,5 | |
| 17 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | | | TCA | | | | | | 12,5 | |
| 18 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 23 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 25 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 26 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | | | | | | TCA | | | 12,5 | |
| 29 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 30 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 33 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 35 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 36 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | | | TCA | | | TCA | | | 25,0 | |
| 37 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | | | TCA | | | | | | 12,5 | |
| 41 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 42 | 0,1 | 0,6 | 0,4 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 45 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 47 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | 0,0 | |
| 48 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | 0,0 | |

| (continuação) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|------------|---|-----|-----|---|-----|---|-----|----------------|-----------|
| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Provedores | | | | | | | | Provedores (%) | Resultado |
| | | | | A | B | C | D | E | F | G | H | | |
| 50 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 51 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | | | | TCA | | | | | | 12,5 |
| 55 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | | | | TCA | | | | | | 12,5 |
| 56 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 58 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 59 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 60 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | TCA | | | | | | | | | 12,5 |
| 63 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | | | | TCA | | | | TCA | | 25,0 |
| 64 | 0,9 | 0,3 | 0,6 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 65 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 67 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | | | TCA | | | TCA | | | | 25,0 |
| 70 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 71 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | | | | TCA | | | | | | 12,5 |
| 73 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | TCA | | | | | TCA | | | | 25,0 |
| 77 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 78 | 0,1 | 0,4 | 0,3 | | | TCA | | | | | | | 12,5 |
| 80 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | | | | | | TCA | | | | 12,5 |
| 83 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 84 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 87 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 88 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | | | | | | TCA | | | | 12,5 |
| 92 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 93 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 95 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 97 | 0,5 | 0,1 | 0,3 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 98 | 0,6 | 0,1 | 0,4 | | | | | | | | | | 0,0 |
| 100 | 0,1 | 0,5 | 0,3 | | | TCA | | | | | | | 12,5 |

Anexo 6 Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento (rolhas positivas)

Tabela A6.1 - Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas positivas pela MDI.

| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Rolhas | Provedores | | | | | | | Resultado | |
|---------|------------------------|------------------------|-------|--------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|
| | | | | | A | B | C | D | E | F | G | | |
| 2 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | | | TCA | | | | | 14,3 | |
| 5 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | | | TCA | | TCA | | | 28,6 | |
| 6 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,9 | | | | TCA | | | | 14,3 | |
| 8 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 44,4 | | | | | | | | 0,0 | |
| 11 | 13,2 | 10,8 | 12,0 | 29,2 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | 85,7 | TCA |
| 14 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | | TCA | | | | | | 14,3 | |
| 16 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | | | | | | | | 0,0 | |
| 18 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | 0,6 | | | | | TCA | | | 14,3 | |
| 19 | 7,9 | 8,0 | 8,0 | 37,8 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | 100,0 | TCA |
| 22 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,6 | | | | | | | | 0,0 | |
| 23 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,4 | | | | | | | TCA | 14,3 | |
| 26 | 1,9 | 2,2 | 2,1 | 15,4 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | 85,7 | TCA |
| 30 | 127,3 | 131,5 | 129,4 | 105,7 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | 100,0 | TCA |
| 31 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,9 | | TCA | | | | | | 14,3 | |
| 33 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 24,9 | | | TCA | | | | | 14,3 | |
| 35 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 17,7 | | | | TCA | TCA | | | 28,6 | |
| 36 | 8,3 | 8,4 | 8,4 | 26,6 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | 100,0 | TCA |
| 39 | 1,5 | 1,8 | 1,7 | 29,7 | | | | | TCA | | | 14,3 | |
| 41 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 1,2 | | | | | | | | 0,0 | |
| 44 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 | |
| 45 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 3,6 | | | | | | | | 0,0 | |
| 47 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 7,0 | | | | TCA | | | | 14,3 | |
| 50 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 8,6 | | TCA | | | TCA | | | 28,6 | |

| (continuação) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|--------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----------|
| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Rolhas | Provedores | | | | | | | Provedores (%) | Resultado |
| | | | | | A | B | C | D | E | F | G | | |
| 52 | 3,6 | 4,8 | 4,2 | 53,0 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | 85,7 | TCA |
| 54 | 8,5 | 8,1 | 8,3 | 73,7 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | 100,0 | TCA |
| 55 | 0,1 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | | | | | | | | 0,0 | |
| 57 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | | | | | | | | 0,0 | |
| 59 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 1,0 | | | | | TCA | | | 14,3 | |
| 60 | 3,8 | 3,1 | 3,5 | 48,0 | TCA | | TCA | | | TCA | TCA | 57,1 | TCA |
| 62 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 17,9 | | | | | TCA | | | 14,3 | |
| 64 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 9,4 | | | | | TCA | | | 14,3 | |
| 66 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 6,4 | | | TCA | | | | TCA | 28,6 | |
| 67 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 29,7 | | | | | | | | 0,0 | |
| 70 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 1,5 | | | | | | TCA | | 14,3 | |
| 71 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 1,2 | | | | | | | | 0,0 | |
| 72 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 1,3 | | | | | | | | 0,0 | |
| 74 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 3,9 | | | | | | | | 0,0 | |
| 76 | 5,5 | 5,1 | 5,3 | 42,6 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | 85,7 | TCA |
| 79 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 20,6 | | | | | | TCA | | 14,3 | |
| 80 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 1,5 | | | | | | | | 0,0 | |
| 82 | 1,2 | 0,8 | 1,0 | 40,9 | | | TCA | TCA | | TCA | TCA | 57,1 | TCA |
| 85 | 0,1 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | | | | | | | | 0,0 | |
| 86 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | | | | | | TCA | | 14,3 | |
| 88 | 3,7 | 3,9 | 3,8 | 52,6 | TCA | TCA | TCA | TCA | TCA | | TCA | 85,7 | TCA |
| 90 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 32,8 | | | | | | TCA | | 14,3 | |
| 93 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 70,0 | | | | | | | | 0,0 | |
| 94 | 1,8 | 1,3 | 1,6 | 40,6 | TCA | | | | | TCA | | 28,6 | |
| 97 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 40,9 | TCA | TCA | TCA | | TCA | TCA | TCA | 85,7 | TCA |
| 99 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 10,8 | | | | | | | | 0,0 | |
| 100 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 1,6 | | | | | | | | 0,0 | |

Anexo 7 Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento (rolhas negativas)

Tabela A7.1 - Resultados obtidos após 2 meses de engarrafamento de vinhos vedados com rolhas consideradas negativas pela MDI.

| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Rolhas | Provedores | | | | | | | Resultado |
|---------|------------------------|------------------------|-------|--------|------------|---|-----|---|-----|---|-----|-----------|
| | | | | | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | | | | | | | | 0,0 |
| 3 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 4 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | | | | | | | | 0,0 |
| 7 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | | | TCA | | TCA | | | 28,6 |
| 9 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,4 | | | | | | | | 0,0 |
| 10 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | | | | | TCA | | | 14,3 |
| 12 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 13 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 15 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | | | | | | | | 0,0 |
| 17 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 20 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 21 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | | | | | | | | 0,0 |
| 24 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 25 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | | | | | | | | 0,0 |
| 27 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | | | | | | | | 0,0 |
| 28 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 3,5 | TCA | | | | | | TCA | 28,6 |
| 29 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,2 | | | | | | | | 0,0 |
| 32 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,7 | | | | | | | | 0,0 |
| 34 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | | | | | | | | 0,0 |
| 37 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | | | | | | | | 0,0 |
| 38 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 40 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |
| 42 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,0 | | | | | | | | 0,0 |

| (continuação) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|--------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|----------------|-----------|
| Amostra | Análise SPME-GC-MS (1) | Análise SPME-GC-MS (2) | Média | Rolhas | Provedores | | | | | | | Provedores (%) | Resultado |
| | | | | | A | B | C | D | E | F | G | | |
| 43 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,0 | | | | | | | | | 0,0 |
| 46 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,0 | | | | | TCA | | | | 14,3 |
| 48 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | | 0,0 |
| 49 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | | | | | | | | | 0,0 |
| 51 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 1,2 | | | | | | | | | 0,0 |
| 53 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 |
| 56 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,7 | | | | | | | | | 0,0 |
| 58 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | | | | | | | | | 0,0 |
| 61 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,9 | | | | | | | | | 0,0 |
| 63 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | | | | | | | | | 0,0 |
| 65 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,9 | | | | | | TCA | | | 14,3 |
| 68 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 1,7 | | | | | | | | | 0,0 |
| 69 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,7 | | | TCA | | | | | | 14,3 |
| 73 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 |
| 75 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | | | | | | | | | 0,0 |
| 77 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,8 | | | | | | | | | 0,0 |
| 78 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | | | | | | | | | 0,0 |
| 81 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | | | | | | | | | 0,0 |
| 83 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | | | | TCA | | | | | 14,3 |
| 84 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 |
| 87 | 0,5 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | 0,0 |
| 89 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 1,5 | | | | | | | | | 0,0 |
| 91 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | | TCA | | | | | | | 14,3 |
| 92 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 |
| 95 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | | | | | | | | | 0,0 |
| 96 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | | | | | | | | | 0,0 |
| 98 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 2,0 | | | | | TCA | | | | 14,3 |