

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes e embalagem.***

**Tese de Mestrado**

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular

**Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial**

**Maria de Fátima Moreira Pimenta**

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



**Departamento de Engenharia Química**

Orientador da FEUP: **Professor Doutor Adélio Mendes**

Orientador da Empresa: **Professor Doutor Miguel Cabral**

**Março de 2009**

## **Agradecimentos**

A presente dissertação foi realizada, no período entre Setembro de 2008 e Março de 2009, no Departamento de Investigação & Desenvolvimento da Amorim & Irmãos S.A. sob orientação dos Professores Doutores Adélio Mendes e Miguel Cabral, a quem desejo desde já agradecer pela oportunidade concedida e condições de trabalho proporcionadas.

Em seguida, passarei a mencionar algumas pessoas, a quem gostaria de agradecer de forma especial pelo acompanhamento e auxílio prestado ao longo do trabalho.

Ao Doutor Paulo Lopes, exemplo de grande profissionalismo e dedicação, pelo incentivo, paciência e convivência enriquecedora. Por me ter fornecido as bases essenciais para a concretização deste trabalho e valorosos comentários.

Ao Doutor Stephan Dahl pelo interesse demonstrado e boa disposição. Além dos seus prestimosos conselhos e conhecimentos transmitidos.

À Doutora Isabel Roseira pela simpatia, gentileza e colaboração oferecidas.

Às colaboradoras do I&D, Eliana Reis, Salomé Reis e Patrícia Oliveira, a integração e auxílio prestados em todas as fases do projecto.

Um muito obrigado, ao amigo Joaquim sempre presente, pela sua boa disposição, paciência e bons momentos proporcionados. Pelo empenho e auxílio em algumas actividades e fases do projecto. Pela permuta de conhecimentos, fundamentais para o sucesso de ambos. E sobretudo pelos bons conselhos e incentivo ao longo destes meses.

À minha família por todo o apoio, compreensão e carinho. A todos um muito obrigado, por me terem acompanhado e encorajado durante a investigação.

## Resumo

A contaminação de vinhos com cloroanisóis e fenóis voláteis tem sido muitas vezes associada, incorrectamente, à rolha de cortiça. Contudo, estudos recentes mostraram que este fenómeno pode advir de outras fontes, nomeadamente do contacto directo com produtos e atmosferas de conservação contaminados.

O estudo foi conduzido de forma a determinar se os diferentes contaminantes exógenos conseguem migrar através dos diferentes vedantes comerciais e contaminar os vinhos engarrafados. As garrafas de vinhos foram vedadas com rolhas de cortiça natural, microaglomeradas, vedantes sintéticos (Nomacorc Light e Premium) e cápsulas de rosca, e armazenadas sob atmosfera contaminada. A atmosfera de conservação foi artificialmente contaminada com cinco compostos deuterados, ( $d_5$ )-2,4,6-tricloroanisol (TCA), ( $d_3$ )-2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), ( $d_5$ )-pentacloroanisol (PCA),  $d_4$ -etilfenol (E4F) e  $d_4$ -etilguaiacol (E4G). Os vinhos e as fracções dos vedantes (exterior, intermédia e interior) foram monitorizados ao longo do tempo para a concentração de  $d_5$ -TCA,  $d_3$ -TeCA,  $d_5$ -PCA,  $d_4$ -E4F e  $d_4$ -E4G por SPME-CG-SM.

Após o primeiro mês de conservação, verificou-se que os diferentes vedantes funcionam como barreiras efectivas à contaminação exógena. A cápsula de PVC confere um efeito protector sobre o gargalo das garrafas.

Paralelamente, verificou-se que o filme “protective packaging” é eficaz como embalagem protectora de rolhas conservadas em ambiente contaminado com  $d_5$ -TCA.

**Palavras-chave:** cloroanisóis, fenóis voláteis, vedante, vinho e contaminação.

## **Abstract**

The contamination of wines with chloroanisoles and volatile phenols has been associated to the cork. However, recent studies showed that these phenomena can come from others sources, such as the directly contact with products and contaminated atmospheres.

The study was conducted to determine whether “taint” compounds from external environment could migrate through different commercial closures and contaminate wines after bottling. The bottled wine was sealed with a natural cork stopper, a microagglomerate cork stopper, a synthetic closure (Nomacorc Light e Premium) and a screw cap, and stored under contaminated environment. The storage atmosphere was artificially contaminated with five deuterium-labeled compounds, (d<sub>5</sub>)-2,4,6-trichloroanisole (TCA), (d<sub>3</sub>)-2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA), (d<sub>5</sub>)-pentachloroanisole (PCA), d<sub>4</sub>-ethylphenol (E4F) and d<sub>4</sub>-ethylguaiacol (E4G). Wines and closures fractions (outer, middle and inner) were assessed over time for the concentration of d<sub>5</sub>-TCA, d<sub>3</sub>- TeCA, d<sub>5</sub>-PCA, d<sub>4</sub>-E4F and d<sub>4</sub>-E4G by SPME-GC-MS. After the first month of conservation, it was observed that the different closures are effective barriers to exogenous contamination. Furthermore, the protection is enhanced by the application of capsule of PVC over the bottleneck.

In addition, it was also showed that that the film "protective packaging" is an effective barrier to the transmission of exogenous contaminants.

**Word-key:** chloroanisoles, volatile phenols, closure, wine and contamination.

# Índice

Índice .....	i
Notação e Glossário .....	ii
<u>1. Introdução</u> .....	1
<u>1.1 Objectivos do trabalho</u> .....	6
<u>1.2 Contributos do trabalho</u> .....	7
<u>1.3 Organização da tese</u> .....	7
2. Estado da arte .....	9
3. Estudo da migração de d <sub>5</sub> -TCA através de embalagem de alumínio.....	12
<u>3.1 Material e Métodos</u> .....	12
<u>3.2 Resultados</u> .....	14
4. Estudo da migração de fenóis voláteis e cloroanisóis através de diferentes vedantes .....	16
<u>4.1 Material e métodos</u> .....	16
<u>4.2 Resultados</u> .....	20
5. Conclusões.....	24
6. Avaliação do trabalho realizado .....	25
<u>6.1 Objectivos realizados</u> .....	25
<u>6.2 Outros trabalhos realizados</u> .....	25
<u>6.3 Limitações e trabalhos futuros</u> .....	26
<u>6.4 Apreciação final</u> .....	26
7. Referências .....	27
8. Anexos .....	30

## Notação e Glossário

<b>A<sub>cont</sub></b>	Valor da área do contaminante
<b>A<sub>cont</sub> *</b>	Valor corrigido da área do contaminante
<b>A<sub>m.p.i.</sub></b>	Valor médio da área do padrão interno
<b>A<sub>p.i.</sub></b>	Valor da área do respectivo padrão interno
<b>CG</b>	Cromatógrafo gasoso
<b>d<sub>4</sub>-E4F</b>	Deutério 4-Etilfenol
<b>d<sub>10</sub>-E4F</b>	Deutério 4-Etilfenol
<b>d<sub>4</sub>-E4G</b>	Deutério 4-Etilguaicol
<b>d<sub>3</sub>-PCA</b>	Deutério Pentacloroanisol
<b>d<sub>5</sub>-TBA</b>	Deutério 2,4,6-Tribromoanisol
<b>d<sub>5</sub>-TCA</b>	Deutério 2,4,6-Tricloroanisol
<b><sup>13</sup>C<sub>6</sub>-TCF</b>	Deutério 2,4,6-Triclorofenol
<b>d<sub>3</sub>-TeCA</b>	Deutério 2,3,4,6-Tetracloroanisol
<b>4-EF</b>	4- Etilfenol
<b>4-EG</b>	4- Etilguaiacol
<b>FEUP</b>	Faculdade Engenharia Universidade do Porto
<b>FEUP-DEQ</b>	Faculdade Engenharia Universidade do Porto – Departamento de Engenharia Química
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
<b>I &amp; D</b>	Investigação e Desenvolvimento
<b>MIEQ</b>	Mestrado Integrado em Engenharia Química
<b>PCA</b>	Pentacloroanisol
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>PVC</b>	Policloreto de vinil
<b>SPME</b>	Microextração em fase sólida
<b>SPME/GC-MS</b>	Microextração em fase sólida com separação por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa.
<b>TBA</b>	2,4,6-Tribromoanisol
<b>TCA</b>	2,4,6-Tricloroanisol
<b>TCF</b>	2,4,6-Triclorofenol
<b>TeCA</b>	2,3,4,6-Tetracloroanisol

# 1. Introdução

O valor da cortiça para a economia nacional é indiscutível; Portugal produz cerca de 300 mil toneladas de cortiça, o que representa 52,5% da produção mundial; transforma cerca de 70% da cortiça mundial, o que gerou em 2007, exportações de 853,8 milhões de euros, dos quais 590 milhões de rolhas de cortiça natural. Este valor representou, em 2007, 0,7% para do PIB nacional, e 2,3% das exportações nacionais (APCOR, 2009).

Distante há milhares de anos, a utilização das rolhas de cortiça no engarrafamento e conservação do vinho, devido às suas propriedades únicas (inerte, flexível, altamente compressível e impermeável a líquidos e gases), fundamentais para a preservação de um bom vinho (Coque *et al.*, 2006).

No entanto, na última década surgiram acusações de que por vezes “a cortiça pode estragar o vinho”, constituindo uma grande preocupação para a indústria corticeira (Chatonnet *et al.* 2004, Capone *et al.* 1999).

Vários compostos têm sido identificados como sendo responsáveis por um elevado número de defeitos encontrados na indústria vitivinícola. Estes são geralmente, muito voláteis, sendo facilmente transmitidos através do ar ou por contacto directo com produtos contaminados (madeira, cortiça, plásticos, silicone, cartão e papel, borracha, etc.). Quando transmitidos ao vinho irão depreciar irreversivelmente a sua qualidade. De entre os principais compostos que provocam desvios sensoriais graves no vinho encontram-se os haloanisóis e os fenóis voláteis.

- **Haloanisóis**

Estruturalmente, estes compostos são considerados derivados do anisol, contendo pelo menos um átomo de halogénio. Existem quatro elementos halogénicos: cloro (Cl), bromo (Br), iodo (I) e flúor (F). Quando um átomo de halogénio está presente numa molécula de anisol, o composto daí resultante é denominado de haloanisól, que dependendo do halogénio presente na molécula pode posteriormente originar cloroanisóis e bromoanisóis, e em menor extensão iodoanisóis e fluoranisóis (Coque *et al.*, 2006).

Os haloanisóis podem ser gerados por diferentes vias metabólicas, no entanto, a formação de cloroanisóis (compostos não tóxicos) a partir de clorofenóis (compostos tóxicos) por reacções de biometilação é a única origem cientificamente comprovada. Esta reacção é maioritariamente executada por fungos filamentosos (*Streptomyces spp.*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.*, *Cephalosporium spp.*, ...), que quando em contacto com clorofenóis presentes em alguns pesticidas, altamente tóxicos, desenvolvem um mecanismo de defesa que conduz à

produção de cloroanisóis. A reacção é catalisada por uma proteína (enzima) denominada por clorofenol O-metiltransferase (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003).

O aparecimento dos precursores dos haloanisóis, os halofenóis, pode ocorrer, quer por reacção directa dos produtos resultantes da degradação da lenhina com o cloro ou bromo (Buser *et al.*, 1982; Saxby *et al.*, 1982); quer pelo uso inadequado de preservantes e desinfectantes industriais cuja constituição engloba compostos clorofenólicos ou bromofenólicos (Figura 1) (Coque *et al.*, 2006).

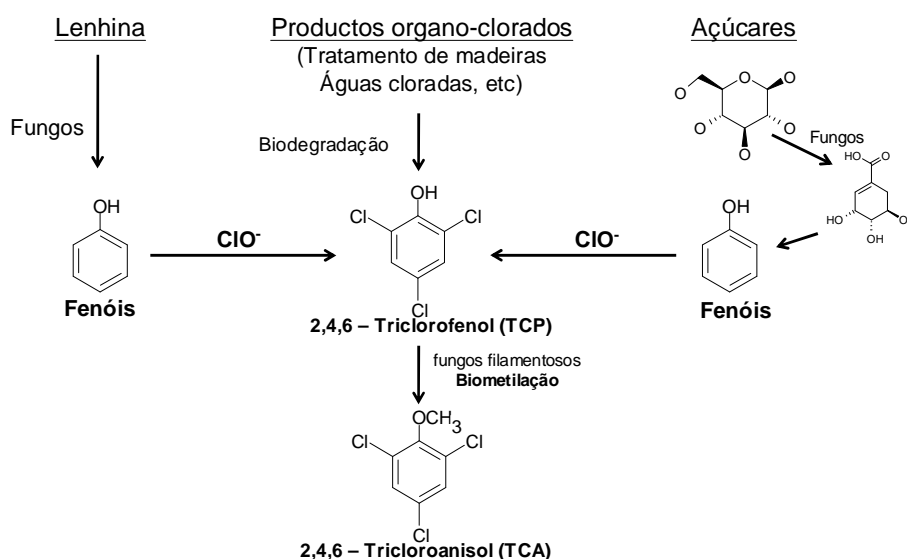


Figura 1 – Mecanismo da formação química do 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

A formação dos restantes cloroanisóis segue o mesmo mecanismo de formação.

Os haloanisóis são substâncias voláteis que possuem um limiar de percepção olfactivo muito baixo em solução hidroalcoólica (da ordem dos  $\text{ngL}^{-1}$ ). O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é o principal composto associado ao “gosto a mofo” nos vinhos, pois é o que apresenta menor limiar de percepção, uma vez que a volatilidade dos haloanisóis diminui com o aumento de átomos de cloro ou bromo. O 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA) e o pentacloroanisol (PCA) são compostos menos voláteis, possuindo limiares de percepção no vinho mais elevados que o TCA, apresentando, no entanto, o mesmo tipo de aroma (Coque *et al.*, 2006).

A contaminação do vinho por haloanisóis, nomeadamente com TCA tem sido associada exclusivamente às rolhas de cortiça. Contudo, estudos recentes mostraram que esta

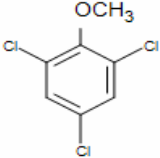
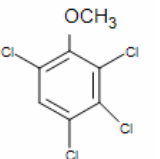
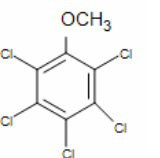


contaminação pode advir de outras fontes, nomeadamente do contacto directo com produtos e atmosferas de conservação contaminados (Chatonnet *et al.* 2004, Capone *et al.* 1999). No caso da contaminação do vinho pela rolha de cortiça duas situações distintas podem acontecer:

I. A rolha de cortiça pode chegar à cave com níveis de haloanisóis elevados, resultantes da contaminação durante o crescimento da cortiça na árvore. A casca da árvore absorve halofenóis que foram transportados através da atmosfera ou pela água da chuva e/ou estão presentes no solo (Coque *et al.*, 2006). Pode ocorrer também uma contaminação durante o processo produtivo de rolhas, principalmente durante as fases de conservação da cortiça, onde se observa uma forte colonização com fungos e bactérias (Buser *et al.*, 1982; Saxby *et al.*, 1982).

II. Por outro lado, as rolhas assim como a madeira e outros materiais (plásticos, silicone, cartão e papel, borracha, etc.) podem chegar à cave completamente isentos de haloanisóis. No entanto, quando armazenados sob atmosferas contaminadas, estes materiais tem a capacidade de sorver haloanisóis por via aérea, mesmo sem um contacto físico directo com a fonte primária de contaminação e depois transmiti-los ao vinho (Barker *et al.*, 2001). Por conseguinte, a rolha de cortiça actuará como veículo transmissor da contaminação, mas a origem desta encontra-se na própria cave.

Tabela 1 – Estrutura, limiares de percepção e origem dos principais cloroanisóis responsáveis pelos aromas fúngicos nos vinhos. (Chatonnet et al., 2007)

Composto	Estrutura	Limite de percepção sensorial no vinho (ngL <sup>-1</sup> )	Aroma	Origem
2,4,6 - Tricloroanisól (TCA)		3	“mofo”; “fungos”	Biometilação do fenol correspondente
2,3,4,6 - Tetracloroanisól (TeCA)		15		
Pentacloroanisól (PCA)		10000		

- **Fenóis Voláteis**

Os fenóis voláteis são metabolitos secundários produzidos por leveduras, fungos e bactérias que afectam negativamente o sabor de alguns alimentos fermentados (Loureiro e Malfeito-Ferreira 2006).

Presentemente, a importância destes compostos é devida principalmente ao seu papel na mediática contaminação a "suor de cavalo" em vinhos tintos.

Embora números precisos não estejam disponíveis, presume-se que a contaminação de fenóis é o principal problema microbiológico na indústria vitivinícola (Fugelsang *et al.* 1993, Loureiro 1996).

A estrutura química dos fenóis voláteis é caracterizada por um anel fenólico e um radical com composições diferentes (Tabela 2). Os principais fenóis voláteis dos vinhos são o 4-etilfenol (4-EF), o 4-etilguaiaacol (4-EG) e o 4-etilcatecol (4-EC). Estas moléculas surgem em vinhos com concentrações díspares, estando normalmente associadas a vinhos ricos em compostos fenólicos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Steinke e Paulson (1964) sugeriram que a produção de 4-etilfenol resulta da acção sequencial de duas enzimas: uma cinamato descarboxilase que transforma os ácidos cinâmicos (p-

cumárico, ferúlico, etc) em vinilfenóis, que por sua vez são reduzidos pela acção de uma vinil-fenol redutase, em etilfenóis (Figura 2). Estas actividades enzimáticas estão relacionadas com a acção de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet, 1995).

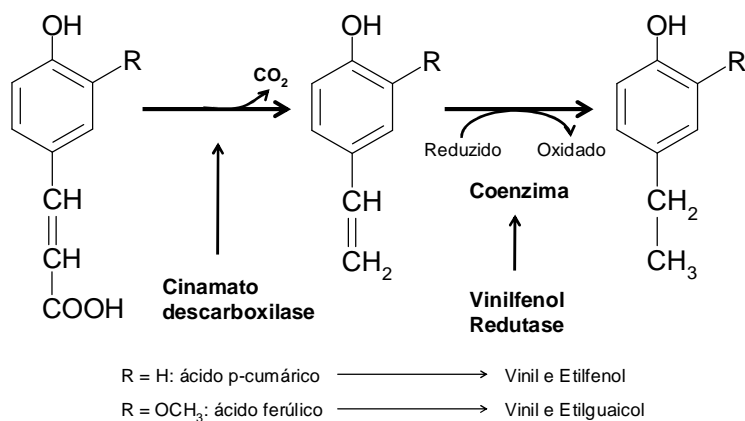


Figura 2 – Mecanismo da formação química de fenóis voláteis.

Todos os vinhos podem apresentar este defeito, sobretudo quando não existem boas condições de higiene na cave. Contudo, vinhos envelhecidos em barricas de carvalho são mais susceptíveis a este tipo de contaminação, porque estes recipientes são meios altamente favoráveis ao desenvolvimento de populações de *Brettanomyces/Dekkera* (Loureiro e Malfeito-Ferreira 2006).

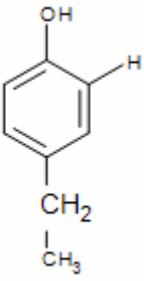
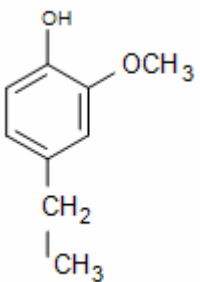
Os atributos organolépticos destes compostos são variáveis, assumindo tanto conotações positivas como negativas, dependendo da sua concentração no vinho (Chatonnet, 1995).

A rejeição de um odor acontece a concentrações mais elevadas do que a detecção, conduzindo a detecções distintas e limites de detecção preferenciais.

Por exemplo, nos vinhos tintos de Bordeaux, o limite de preferência para o 4-EF é aproximadamente 620 gL<sup>-1</sup>, e para a mistura (10:1) de 4-EF e 4-EG é 426 gL<sup>-1</sup> (Chatonnet *et al.* 1992).

Abaixo destas concentrações, os fenóis voláteis podem contribuir favoravelmente à complexidade do aroma do vinho transmitindo notas aromáticas de especiarias, couro, fumo, que pode ser apreciado por alguns consumidores. Para concentrações de 4-EF e 4-EG acima dos limites de preferência dominam aromas indesejáveis do tipo fenolado (“suor de cavalo”, “estrebaria”, “couro”, “animal”) que depreciam irreversivelmente a qualidade dos vinhos (Chatonnet *et al.*, 1992).

Tabela 2 – Estrutura, limiares de percepção e origem dos principais fenóis voláteis (Boutou e Chatonnet, 2007).

Composto	Estrutura	Limite de percepção sensorial no vinho ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	Aroma	Origem
<b>4 -Etilfenol (4-EF)</b>		430	“fenol”; “couro”; “cavalo”	Leveduras do género <i>Brettanomyces/ Dekkera</i>
<b>4-Etilguaiacol (4-EG)</b>		33		

### 1.1 Objectivos do trabalho

Actualmente, existem poucos estudos sobre o fenómeno envolvido na contaminação de vinhos após o engarrafamento, nomeadamente quando estes são conservados sob atmosfera altamente contaminada. O papel dos vedantes neste fenómeno é crucial, como ficou recentemente mostrado nos ensaios em curso no departamento de I&D da Amorim & Irmãos, Lopes (2008) e Lino (2008). Neste estudo verificou-se que os vedantes sintéticos, ao contrário das rolhas de cortiça (técnicas e naturais), não constituíram uma protecção eficaz à contaminação atmosférica de uma solução hidroalcoólica após engarrafamento. Com base nos resultados do projecto anterior, pretendeu-se alargar o estudo da contaminação atmosférica a outros cloroanisóis e fenóis voláteis (presentes nos principais locais de conservação do vinho), incluindo também um maior número de vedantes (rolhas de cortiça técnicas e naturais, vedantes sintéticos e cápsulas de rosca) sob condições de conservação mais próximas da realidade. O efeito protector da cápsula de PVC sobre o gargalo das garrafas foi também

avaliado. Paralelamente, determinou-se a eficácia do filme “protective packaging” como embalagem protectora de rolhas conservadas em ambiente contaminado com  $d_5$ -TCA.

## **1.2 Contributos do trabalho**

As contaminações por cloroanisóis e fenóis voláteis provocam nas empresas produtoras de vinho perdas económicas significativas. Assim é urgente clarificar quais as principais fontes de contaminação destes defeitos e de que modo o tipo de vedante pode contribuir para a restrição ou amplificação dos efeitos deste fenómeno.

A Amorim & Irmãos S.A. está consciente da importância da problemática, neste contexto surgiu a necessidade de se proceder a este estudo que decorre no departamento de Investigação & desenvolvimento. Este projecto é suplementar ao estudo de migração de  $d_5$ -TCA e  $13C_6$ -TCF da atmosfera de conservação para uma solução hidroalcoólica engarrafada, que ainda decorre nesse departamento.

Os principais contributos deste projecto visam a elucidação do efeito barreira que os vedantes mais representativos do mercado (cortiça, sintético e rosca) associados às cápsulas de PVC, apresentam quando as garrafas de vinho são expostas a um ambiente contaminado com cloroanisóis e fenóis voláteis. Paralelamente, iniciou-se o desenvolvimento e optimização de um novo método analítico que permitiu detectar e quantificar os 5 contaminantes estudados, numa única análise. Este desenvolvimento foi crucial pois num futuro próximo, esta análise incluirá todos os principais compostos responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos, permitindo ao departamento de I&D da Amorim fornecer um serviço eficiente aos seus clientes, nomeadamente em termos de reclamações.

Por outro lado validou-se uma embalagem protectora que poderá ser utilizada futuramente para acondicionar rolhas de cortiça, mesmo em locais contaminados.

## **1.3 Organização da tese**

Esta tese está organizada em 6 capítulos. Em seguida é descrito de forma sucinta o que cada um deles irá tratar.

O capítulo 1, Introdução, proporciona ao leitor a informação básica necessária, de forma a facilitar o enquadramento dos objectivos e dos resultados em que se baseia a presente investigação. Neste capítulo são abordados alguns conceitos sobre a contaminação de vinhos

por cloroanisóis e fenóis voláteis. Este capítulo apresenta ainda os aspectos inovadores e de realce do trabalho, bem como os benefícios trazidos para a instituição.

O capítulo 2, Estado da arte, descreve o conhecimento actual do problema em estudo, onde são referidos alguns estudos que serviram de apoio à presente investigação.

O capítulo 3 apresenta a metodologia adoptada e os resultados obtidos no estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA através de embalagem de alumínio.

O capítulo 4 descreve a metodologia referente ao estudo da migração de fenóis voláteis e cloroanisóis através de diferentes vedantes e os resultados relativos ao ponto de análise após o primeiro mês de conservação

O capítulo 5 apresenta as principais conclusões alusivas aos resultados obtidos no trabalho elaborado.

O capítulo 6 é dedicado à avaliação geral do trabalho executado.

## 2. Estado da arte

A presença de fenóis voláteis no vinho é um sinal da actividade das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*. Estes microrganismos crescem no interior das adegas, especialmente nos barris de madeira velhos, uma vez que estes locais proporcionam um ambiente nutricional e quimicamente favorável para o crescimento lento de *Brettanomyces bruxellensis*: ambiente húmido, envelhecimento do vinho em barris por longos períodos; pH do vinho; arejamento do vinho no tanque e no barril (ITV France, 2006).

Em vinhos secos, Chatonnet *et al.* (1992, 1995) referiram que *Dekkera* sp. pode crescer devido ao consumo de quantidades residuais de açúcares, como glucose, frutose, galactose e trealose. O etanol também pode servir de substrato se existirem condições de aerobiose, como é possível acontecer, por exemplo, à superfície do vinho mantido em barricas mal vedadas ou de cubas sem sulfuradores eficientes (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2000).

Um dos factores que pode inibir o crescimento de *Dekkera* é o teor em dióxido de enxofre (Froudière e Larue, 1989) e vinhos armazenados a temperaturas baixas são menos susceptíveis ao aparecimento de 4-EF (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2000).

O 4-EF é o principal fenol volátil, que confere ao vinho um aroma desagradável conhecido como cheiro a "couro", "suor de cavalo" ou "estrebria"; o 4-EG transmite aromas indesejáveis a "toucinho" e a "fumaça" (Chatonnet, 1995, Loureiro, 1996). No entanto, em teores reduzidos, estes compostos podem contribuir para a complexidade aromática do vinho (Chatonnet, 1995, Loureiro, 1996). O problema é que quando estes compostos são descobertos, é frequentemente muito tarde para actuar, pois não existem técnicas que possibilitem uma remoção eficaz destes compostos sem afectar a qualidade do vinho.

A verdadeira incidência de fenóis voláteis nos vinhos não é conhecida com precisão, talvez devido à dificuldade de executar análises instrumentais de rotina em adegas. O CG-SM pode identificar e quantificar o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol com uma sensibilidade bastante elevada. Associando esta técnica a uma análise sensorial efectuada por um provador experiente obtém-se uma ferramenta poderosa no controlo da qualidade do vinho. Neste momento, o departamento de I&D da Amorim & Irmãos, não possui nenhum método analítico que permita a análise destes compostos, que muitas vezes são associados, incorrectamente, à rolha de cortiça.

Embora números precisos não estejam disponíveis, presume-se que a contaminação de fenóis é o principal problema microbiológico do vinho conduzindo a elevadas perdas económicas nas empresas do sector (Fugelsang *et al.*, 1993, Loureiro, 1996).

Estudos realizados em vinhos franceses mostraram que 36% dos vinhos tintos possuíam teores de 4-etilfenol acima do limite de preferência de  $426 \mu\text{gL}^{-1}$  (Chatonnet, 1995). Em vinhos tintos italianos, Di Stefano (1985) observou que 40% possuíam teores destes fenóis voláteis acima do referido limiar. Em vinhos portugueses Malfeito-Ferreira *et al.* (1989) verificou que 42% dos vinhos tintos continham teores destes fenóis voláteis acima do limiar de preferência organoléptico. Malfeito-Ferreira *et al.* (1989) observou, ainda, que 27% destes vinhos possuíam teores de 4-etilfenol superiores ao limite de preferência de  $620 \mu\text{gL}^{-1}$ . Pelo contrário, os vinhos brancos são pouco afectados por este problema, uma vez que possuem quantidades residuais dos precursores destes compostos (Malfeito-Ferreira *et al.* 2001).

Buser *et al.* (1982) relacionaram o “gosto a mofo” em vinhos com a presença do composto TCA. Apesar de vários compostos estarem correlacionados com este defeito, este é normalmente referido como o principal composto responsável por este problema, 80 a 85% (Amon *et al.*, 1989, Simpson *et al.*, 2004). Outros cloroanisóis (TeCA e o PCA) têm sido identificados como co-responsáveis pelo gosto a mofo (Coque *et al.*, 2006). Chatonnet *et al.* (1994) refere que o odor mais intenso se deve ao TeCA e ao TCA. O PCA é considerado muito menos aromático e responsável por odores mais “fenólicos” do que a “mofo”.

Embora números precisos sobre a incidência deste problema não estejam disponíveis, sabe-se que é um dos principais defeitos do vinho conduzindo a elevadas perdas económicas nas empresas do sector. A proporção de garrafas afectadas por este defeito varia segundo o estudo considerado, de 0,5 a 7% (Lee e Simpson, 1993; Butzke *et al.*, 1999; Juanola *et al.*, 2005).

Geralmente a rolha de cortiça é considerada como o principal responsável pela transferência desse composto ao vinho engarrafado. Contudo, segundo estudos recentes, a proporção de rolhas contaminadas por TCA detectadas em avaliações de qualidade efectuadas por uma das maiores caves australianas foi de cerca de 1%, sendo este valor inferior ao que encontra na generalidade dos vinhos engarrafados na Austrália, 5% (Simpson *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que existem outros compostos e outras fontes envolvidas na contaminação dos vinhos engarrafados. Chatonnet *et al.* (2004) identificaram um composto, 2,4,6-tribromoanisol (TBA), como responsável por um “gosto a mofo” semelhante ao produzido pelo TCA e verificaram que a contaminação provinha da cave uma vez que, os vinhos contaminados nunca estiveram em contacto com a cortiça.

A contaminação do vinho pela rolha de cortiça está intimamente ligada com a localização de TCA na rolha (Pollnitz *et al.* 1996, Capone *et al.*, 1999). Presumivelmente, só quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto directo com o vinho (ou a *câmara de ar* acima do vinho), se dá a transferência dos cloroanisóis a partir da cortiça para o



vinho (Amon e Simpson 1986, Capone et al. 1999). Consequentemente, a localização do TCA na rolha e a orientação da rolha durante o engarrafamento são parâmetros fundamentais que contribuem para a contaminação ou não do vinho (Pollnitz *et al.* 1996; Capone *et al.* 1999 e 2002). Estes resultados foram confirmados recentemente, num estudo realizado no departamento de I&D da Amorim & Irmãos em colaboração com a FEUP que mostrou que o TCA presente no interior da rolha de cortiça não é susceptível de migrar para o vinho.

Outra fonte possível de contaminação dos vinhos é por contaminação atmosférica ou aérea. Por contaminação cruzada, i.e. os contaminantes são sorvidos por diferentes materiais, incluindo as rolhas de cortiça, que posteriormente em contacto com o vinho irão contaminá-lo. Por outro lado, os contaminantes atmosféricos (cloroanisóis, fenóis voláteis e outros) podem permear a embalagem (ex. barricas) durante o período de conservação e contaminar o vinho. Os estudos efectuados sobre a migração atmosférica de contaminantes através de diferentes vedantes após o engarrafamento são muito escassos. Capone *et al.* (2002) mostrou que a rolha de cortiça é uma barreira efectiva à migração de  $d_5$ -TCA da atmosfera para o vinho, em 90 % dos casos, o  $d_5$ -TCA ficava absorvido no primeiro terço da rolha. Recentemente, Lino (2008) mostrou que as rolhas de cortiça, natural e aglomeradas, são barreiras efectivas à migração de  $d_5$ -TCA e  $^{13}C_6$ -TCF para o vinho engarrafado, o que não acontece quando as garrafas são vedadas com vedantes sintéticos, que permitem a contaminação do vinho. Estes resultados mostraram que existe uma boa correlação entre a migração dos compostos acima descritos e as permeabilidades dos diferentes vedantes (Lopes *et al.* 2007). Contudo, estes estudos foram realizados em atmosfera de conservação individualizada e utilizaram apenas 3 vedantes (rolha de cortiça, natural e aglomerada, e vedante sintético). Assim, este trabalho pretende complementar e prorrogar os estudos acima referidos, alargando-o a outros contaminantes das caves (outros cloroanisóis e fenóis voláteis) e a um maior espectro de vedantes (rolhas de cortiça técnicas e naturais, outras gamas de sintéticos e cápsulas de rosca). O efeito protector da cápsula de PVC sobre o gargalo foi também estudado.

### 3. Estudo da migração de d<sub>5</sub>-TCA através de embalagem de alumínio

O objectivo deste estudo foi de avaliar o efeito barreira de um filme de poliéster/alumínio/polietileno à contaminação atmosférica de d<sub>5</sub>-TCA. Em última análise, pretendia-se validar este produto para uma futura utilização como embalagem de rolhas de cortiça natural.

#### 3.1 Material e Métodos

- **Preparação das rolhas**

Numa primeira fase maceraram-se individualmente, 50 rolhas de cortiça natural (Anexo BI). Estas rolhas não eram lavadas e apresentavam as seguintes dimensões: 44 mm de comprimento por 24 mm de diâmetro. As macerações foram realizadas com aproximadamente 45 mL de solução hidroalcoólica (12 % v/v) por rolha, durante 24 h à temperatura ambiente. As concentrações de d<sub>5</sub>-TCA foram analisadas em cada rolha por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-SM). O protocolo de preparação das amostras e as condições operatórias do CG e calibração encontram-se descritos nos Anexos AIII e BIII. A partir das 50 rolhas analisadas, seleccionaram-se as 40 com teores de d<sub>5</sub>-TCA inferiores ou iguais a 0,5 ngL<sup>-1</sup>.

- **Preparação da solução contaminante de d<sub>5</sub>-TCA**

Usou-se d<sub>5</sub>-TCA para contaminar artificialmente os frascos, prevenindo assim posteriores adulterações nos resultados caso as rolhas já se encontrassem contaminadas com TCA.

0,1258g de cristais de d<sub>5</sub>-TCA foram solubilizados em 100 mL de solução etanólica 96%, obtendo-se assim uma solução de concentração 1,258 gL<sup>-1</sup>. Esta solução foi guardada no frigorífico antes da sua utilização.

Neste estudo pretendeu-se contaminar os frascos de conservação (2L) com aproximadamente 1µg de d<sub>5</sub>-TCA adicionando 1 mL de solução contaminante.

Calculou-se assim a concentração aproximada da solução de d<sub>5</sub>-TCA a colocar no frasco:

$$conc.solução \approx \frac{1\mu g}{1mL} \times \frac{1000mL}{1L} \approx 1000 \frac{\mu g}{L} \quad (3.1)$$

Assim, foi então necessário diluir 1000 vezes a solução mãe para obter uma concentração final  $1258 \mu\text{gL}^{-1}$ .

- **Embalagem**

Os mini-sacos testados foram fornecidos pela empresa Protective Packaging Limited (Cheshire, Inglaterra).

O filme compreende 3 camadas de diferentes materiais ligadas entre si com cola ou extrusão de polietileno.

Cada camada tem um objectivo específico. A camada externa é de poliéster, pois é um material resistente a temperaturas elevadas, possui uma boa resistência mecânica e é impermeável à água protegendo a camada de alumínio.

A camada intermédia, de alumínio, impede que o vapor de água, oxigénio e gases agressivos permeiem a embalagem.

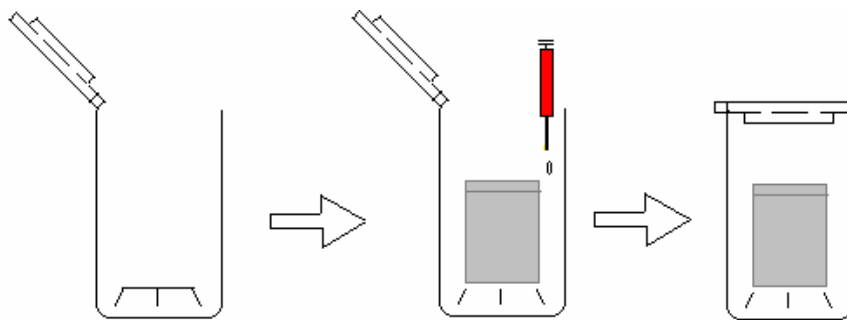
Finalmente uma camada de polietileno que permite que a o filme seja lacrado a quente.

A embalagem apresentava as seguintes dimensões: 177 mm de comprimento por 130 mm de altura e espessura de 25  $\mu\text{m}$ .

- **Contaminação da atmosfera de conservação**

Preparou-se os frascos de vidro (2 L) para a conservação. No seu interior foi colocado, um papel de filtro no fundo e um apoio metálico por cima, para suportar o saco e impedir que este fique em contacto directo com a solução contaminante.

As 40 rolhas previamente seleccionadas foram colocadas em 10 mini-sacos, i.e. 4 rolhas por cada saco. Os sacos foram em seguida lacrados a quente e colocados nos frascos de conservação. Em seguida, contaminaram-se individualmente os frascos com  $1,258 \mu\text{g}$  de  $d_5$ -TCA (aplicou-se no papel de filtro 1 mL de solução contaminante, de concentração  $1258 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Os frascos foram cobertos, no topo, com papel de alumínio e parafilme antes do fecho (Figura 3).



*Figura 3 - Esquema da metodologia de contaminação dos frascos.*

Finalmente procedeu-se ao armazenamento dos frascos num local isolado, onde as condições de temperatura e humidade não são controladas (i.e. condições ambiente). Após 2 meses de conservação, abriram-se os frascos e retiram-se os sacos. Estes foram abertos e as rolhas analisadas individualmente segundo o protocolo acima referido (maceração seguida de análise por CG-SM) e descrito nos Anexos AIII, BI e BIII.

### **3.2 Resultados**

Os resultados obtidos mostram que não foi detectado  $d_5$ -TCA na superfície das rolhas conservadas no interior dos sacos de complexo de alumínio (Tabela 3). Contudo, os frascos encontravam-se altamente contaminados; não tendo sido determinado o nível de contaminação analiticamente (razões de ordem técnica), mas sim sensorialmente.

Os valores obtidos encontram-se abaixo dos limites de quantificação do aparelho utilizado.

Concretamente, não se observaram diferenças significativas entre os níveis iniciais de  $d_5$ -TCA e os obtidos no final do ensaio. Assim, podemos afirmar que os sacos testados são barreiras efectivas à migração de  $d_5$ -TCA. Estes sacos poderão ser uma boa opção de embalagem das rolhas de cortiça natural, pois conferem-lhes uma protecção bastante efectiva sob condições de conservação em ambientes altamente contaminados. Este facto constitui uma mais-valia importante pois pode contribuir para a minimização da contaminação cruzada dos vinhos pela rolha.

*Tabela 3 - Quantidade de d<sub>5</sub>-TCA nas rolhas, no início do ensaio e após 2 meses de conservação sob atmosfera contaminada com 1,258 µg de d<sub>5</sub>-TCA.*

<b>Saco</b>	<b>Rolha</b>	<b>d<sub>5</sub>-TCA ngL<sup>-1</sup> inicial</b>	<b>d<sub>5</sub>-TCA ngL<sup>-1</sup> final</b>	<b>Saco</b>	<b>Rolha</b>	<b>d<sub>5</sub>-TCA ngL<sup>-1</sup> inicial</b>	<b>d<sub>5</sub>-TCA ngL<sup>-1</sup> final</b>
1	71	0	0	6	236	0,1	0
	124	0,1	0		334	0	0
	226	0	0		497	0	0
	611	0,1	0		791	0,2	0
2	83	0,2	0	7	65	0	0
	197	0,5	0		321	0	0
	244	0,1	0		541	0,1	0
	681	0	0		875	0	0
3	223	0,1	0	8	773	0,5	0
	333	0,1	0		829	0,5	0
	618	0	0		830	0	0
	769	0,3	0		897	0,3	0
4	113	0,1	0	9	1	0	0
	274	0,2	0		12	0,3	0
	469	0,1	0		129	0	0
	634	0	0,1		171	0,3	0
5	48	0	0	10	301	0,5	0
	100	0	0		341	0	0
	156	0,2	0		631	0,5	0
	374	0,3	0		787	0	0

## 4. Estudo da migração de fenóis voláteis e cloroanisóis através de diferentes vedantes

Este capítulo é dedicado ao estudo da migração de alguns contaminantes atmosféricos através dos vedantes mais representativos do mercado (rolhas de cortiça técnicas e naturais, vedantes sintéticos e cápsulas de rosca). Em simultâneo, avaliou-se também em que medida as cápsulas de PVC são eficientes como protecção adicional.

Em resumo, expôs-se 180 garrafas vedadas com diferentes vedantes a um ambiente altamente contaminado, com fenóis voláteis e cloroanisóis, e mediu-se periodicamente o teor de d<sub>5</sub>-TCA, d<sub>3</sub>-TeCA, d<sub>3</sub>-PCA, d<sub>4</sub>-E4F e d<sub>4</sub>-E4G, no vinho e nos vedantes.

### 4.1 Material e métodos

- **Optimização do método de análise**

Numa primeira fase do projecto foi necessário desenvolver e otimizar um novo método analítico, que permitisse quantificar cloroanisóis (d<sub>5</sub>-TCA, d<sub>3</sub>-TeCA e d<sub>3</sub>-PCA) e fenóis voláteis (d<sub>4</sub>-E4F e d<sub>4</sub>-E4G), numa única análise. Todos os compostos utilizados no decorrer do trabalho foram deutérios, para se distinguir a contaminação artificial de uma eventual contaminação natural.

O método escolhido foi adaptado de um artigo científico de Boutou e Chatonnet, (2007).

Num primeiro ensaio verificou-se se era possível aplicar o método desenvolvido por Boutou e Chatonnet no equipamento disponível em laboratório. A partir deste método, adaptou-se as condições operatórias ao objectivo do trabalho, a quantificação de fenóis voláteis e cloroanisóis numa só análise.

Após alguns pré-ensaios teste decidiu-se utilizar as seguintes condições operatórias:

**Cromatografo Gasoso:** Agilent 6890;

**Fibra:** DVB/CAR/PDMS (diferente da utilizada na rotina do laboratório)

**Modo operatório:** num vial que contém  $\pm 3$  g de NaCl, adiciona-se 10 mL de amostra (vinho ou solução hidroalcoólica), 100  $\mu$ L de d<sub>5</sub>-TBA (padrão interno dos cloroanisóis), de concentração 25  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, e 100  $\mu$ L de d<sub>10</sub>-E4F (padrão interno dos fenóis voláteis), de concentração 0,1 g L<sup>-1</sup>. A quantificação dos contaminantes é efectuada por HS-SPME/CG/SM. A pré-incubação ocorre durante 3 min a 55°C (250 rpm) e a extracção é realizada durante 60 min a 55°C (250 rpm). A desorção da fibra no injector procede-se durante 5 min a 270°C.

Especificações do equipamento ver Anexo A-II.

- **Preparação do ensaio**

#### Vedantes

Foram testados cinco diferentes tipos de vedantes, rolhas de cortiça natural (38 mm de comprimento por 24 mm de diâmetro); rolhas de cortiça técnicas, Neutrocork (38 mm x 24 mm), vedantes sintéticos, Nomacorc light (40 mm x 22 mm) e Nomacorc Premium (44 mm x 22 mm) e cápsulas de rosca saranex.

As rolhas de cortiça foram cedidas pela unidade industrial Amorim & Irmãos S.A. (Santa Maria de Lamas, Portugal) e os vedantes sintéticos foram adquiridos no mercado. As cápsulas de rosca foram cedidas pela empresa vitivinícola Sogrape. As especificações dos diferentes vedantes encontram-se descritas no Anexo F. As rolhas de cortiça, natural e Neutrocork, foram lavadas com peróxido de hidrogénio e tratadas com óleo de silicone/parafina (50/50) e um elastómero de parafina, respectivamente. Os produtos de tratamento de superfície dos vedantes sintéticos são desconhecidos.

#### Garrafas

Garrafas tipo cantil (Botijo) de 375 mL de cor verde fornecidas pela empresa Sogrape. O perfil do gargalo da garrafa utilizada encontra-se representado no Anexo G

#### Vinho

Utilizou-se um vinho branco Terra Franca da colheita de 2008, fornecido pela empresa vitivinícola Sogrape. A composição química do vinho encontra-se representada na Tabela 4.

Tabela 4 – Propriedades físico químicas do vinho, ensaio realizado pela CVRVV.

Ensaio Método	Resultado	Unidade
<b>Título alcoométrico volúmico adquirido</b> MI 108, ed.05 (espectrofotometria de infravermelho próximo)	10,0	% vol.
<b>Massa volúmica</b> MI 109, ed.04 (densimetria electrónica)	0,99598	g·cm <sup>-3</sup>
<b>Acidez total</b> Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 13 (titulação potenciométrica)	5,7	g(ácido tartárico)·dm <sup>-3</sup>
<b>Acidez volátil</b> MI 009, ed.08 (SFA)	0,12	g(ácido acético)·dm <sup>-3</sup>
<b>Acidez fixa</b> Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 15	5,6	g(ácido tartárico)·dm <sup>-3</sup>
<b>pH</b> Regulamento (CEE) 2676/90, anexo 24	3,11	

### Engarraamento

O engarraamento ocorreu no dia 7 de Janeiro de 2009, nas instalações da Sogrape em Avintes. As garrafas foram cheias a 62 mm do topo da garrafa e vedadas com os diferentes vedantes. Os vedantes cilíndricos foram todos misturados na tremonha da máquina de engarraar, de forma a reduzir o tempo de engarraamento e minimizar o número de paragens da linha de enchimento. O engarraamento das cápsulas de rosca foi realizado em último, devido à sua especificidade, uma vez que requer uma máquina de engarraar diferente.

No total foram engarraadas e vedadas 180 garrafas, i.e 40 por cada tipo vedante cilíndrico e 20 por cápsula de rosca. No caso dos vedantes cilíndricos, 20 garrafas foram cobertas com cápsulas de PVC (apenas o gargalo) e as outras 20 foram deixadas sem qualquer protecção adicional.

### Contaminação e armazenamento

A preparação da solução contaminante, tal como no estudo anterior, teve por base o trabalho de Lopes (2008).

Resumidamente, colocou-se um saco de alumínio (883 mm de comprimento por 1167 mm de altura) dentro de uma caixa de cartão (597 mm de comprimento, 375 mm de largura e 466 mm de altura). No interior do saco colocaram-se 45 garrafas, 5 por cada modalidade (vedante com e sem cápsula de PVC), na posição horizontal. A contaminação da atmosfera foi realizada com adição de 3 mL de cada solução contaminante, solução de cloroanisóis (61



mgL<sup>-1</sup> de d<sub>5</sub>-TCA, 40 mgL<sup>-1</sup> de d<sub>3</sub>-TeCA e 42 mgL<sup>-1</sup> de d<sub>3</sub>-PCA) e solução de fenóis voláteis (60,1 gL<sup>-1</sup> de d<sub>4</sub>-E4F e 5,3 gL<sup>-1</sup> de d<sub>4</sub>-E4G). A quantidade total teórica em cada saco foi de 183 µg de d<sub>5</sub>-TCA, 120 µg de d<sub>3</sub>-TeCA, 126 µg de d<sub>3</sub>-PCA, 180 mg de d<sub>4</sub>-E4F e 16 mg de d<sub>4</sub>-E4G. Em cada caixa colocaram-se 3 papéis de filtro (distribuídos aleatoriamente), adicionando-se a cada um deles 1 mL de solução contaminante de cloroanisóis e 1 mL de solução de fenóis voláteis.

Após a contaminação, os sacos de alumínio foram rapidamente lacrados a quente. Finalmente selou-se a caixa de cartão com fita-cola. Repetiu-se o procedimento anterior para outros quatro sacos. As caixas foram em seguida armazenadas num local de temperatura e humidade não controladas durante os 24 meses de ensaio.

#### Quantificação dos contaminantes nas rolhas e no vinho

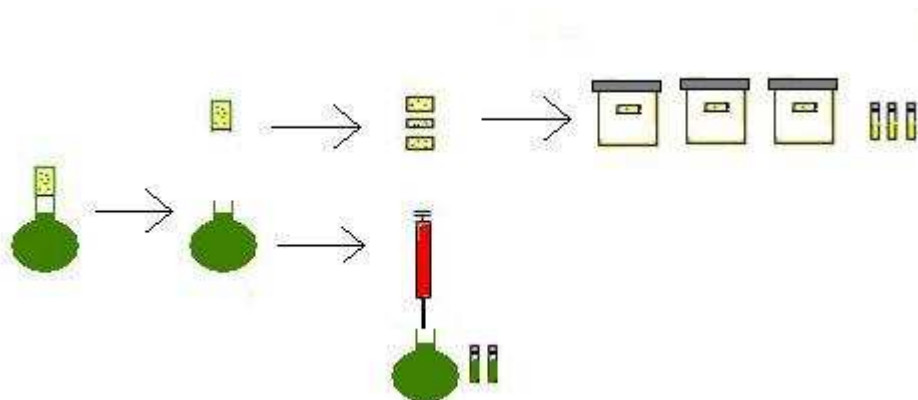
O estudo foi planeado para 24 meses de forma a simular um ensaio de engarrafamento de média duração. Foram previstas medições periódicas de cloroanisóis e fenóis voláteis, no vinho e nos vedantes, após 1, 3, 12 e 24 meses de conservação. Em cada período de análise, foram analisadas 45 garrafas, 5 por cada modalidade em estudo. No total, foram abrangidas 9 modalidades, duas por cada tipo de vedante cilíndrico (com e sem cápsula de PVC) e as cápsulas de rosca.

Neste relatório descreve-se apenas o ponto de análise após o primeiro mês de conservação. A caixa de cartão e o respectivo saco de alumínio foram abertos, retirando-se as garrafas, que foram imediatamente cobertas no gargalo com papel de alumínio para impedir posteriores perdas de contaminantes para a atmosfera. As garrafas foram colocadas a arejar durante aproximadamente 24 horas, para evitar contaminações no laboratório.

Em cada garrafa o gargalo foi cortado e o vinho analisado, admitindo o seguinte modo operativo: cortou-se o gargalo na altura do “headspace”, realizando em primeiro lugar um pequeno corte com o auxílio de uma rebarbadora e depois através de um batimento numa pedra, o gargalo destaca-se do resto da garrafa. O gargalo foi imediatamente envolvido em papel de alumínio para posterior análise. Da garrafa tiram-se 10 mL de vinho para análise dos contaminantes (cloroanisóis e fenóis voláteis) por CG-SM seguindo o protocolo descrito anteriormente em detalhe.

Posteriormente, quebrou-se os gargalos, com o auxílio de um martelo, e seccionou-se as rolhas em três partes idênticas (superior, central e inferior), que foram maceradas individualmente, com solução hidroalcoólica (12% v/v), durante 24 horas (Figura 4).

Finalmente, procedeu-se à quantificação dos contaminantes nos diferentes macerados por CG-SM, conforme descrito no procedimento acima.



*Figura 4 - Esquema da quantificação dos cloroanisóis e fenóis voláteis, no vinho e nos vedantes.*

- **Tratamento Estatístico dos dados**

Os resultados foram sujeitos a análise estatística, usando uma aplicação informática baseada no Microsoft Office Excel, o XLSTAT – Statistical software. Neste programa realizou-se os testes de Tukey e de Fisher.

## **4.2 Resultados**

Este estudo foi projectado para 24 meses. Contudo, apenas foi possível realizar o primeiro ponto de análise, uma vez que este estágio tem uma durabilidade inferior a 6 meses. Assim apenas se realizou a análise após o primeiro mês de conservação.

Ao fim do primeiro mês de conservação observou-se que os vinhos não se encontravam contaminados com qualquer dos compostos testados ( $d_5$ -TCA,  $d_3$ -TeCA,  $d_3$ -PCA,  $d_4$ -E4F e  $d_4$ -E4G) ( $p=0,05$ ).

Apesar de não ter sido realizada nenhuma análise para determinar o teor de contaminantes que ainda se encontravam no saco, sensorialmente era ainda possível detectar que a atmosfera envolvente ainda se encontrava bastante contaminada.

Relativamente aos vedantes cilíndricos, observou-se que a parte em contacto com a atmosfera (parte superior) absorveu uma quantidade significativa dos contaminantes em estudo, principalmente  $d_5$ -TCA (Figura 5),  $d_3$ -TeCA (Figura 7) e  $d_4$ -E4F (Figura 6). Relativamente ao  $d_5$ -TCA e  $d_3$ -TeCA, observou-se que a cápsula de PVC protege a sorção destes compostos pelos diferentes vedantes, uma vez que a sorção destes compostos foi significativamente superior nos vedantes sem cápsula de PVC, onde foram apenas detectados traços destes

compostos ( $p < 0,001$ ). Observou-se também que os valores de  $d_5$ -TCA sorvidos pelos diferentes vedantes são significativamente superiores aos de  $d_3$ -TeCA; este resultado era esperável pois o  $d_5$ -TCA é muito mais volátil que o  $d_3$ -TeCA. Este último composto foi absorvido em concentrações mais elevadas nas rolhas de cortiça natural. Os valores de  $d_5$ -TCA e  $d_3$ -TeCA apresentados pelo “liner” das roscas são significativamente diferentes daqueles obtidos pelos vedantes cilíndricos sem cápsula ( $p < 0,001$ ), mas idênticos aos valores dos apresentados pelos mesmos vedantes protegidos com PVC ( $p = 0,05$ ).

No que diz respeito ao  $d_4$ -E4F observa-se um efeito cápsula estatisticamente significativo para os vedantes cortiça natural e Neutrocork ( $p < 0,001$ ); enquanto que para os vedantes Nomacorc, Light e Premium, não se observa este efeito, embora a tendência seja para uma menor sorção destes compostos quando o gargalo está protegido com a cápsula.

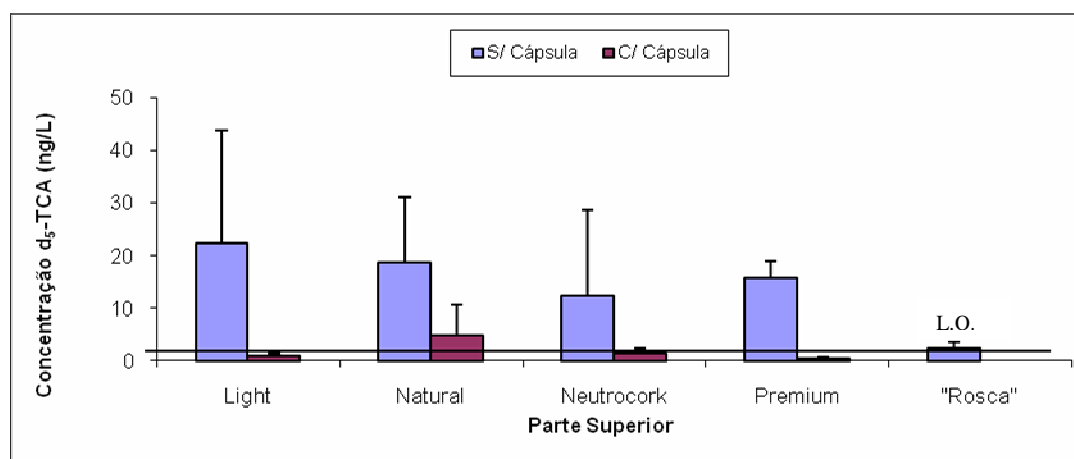


Figura 5 – Concentração de  $d_5$ -TCA na parte superior dos diferentes vedantes com e sem cápsula.

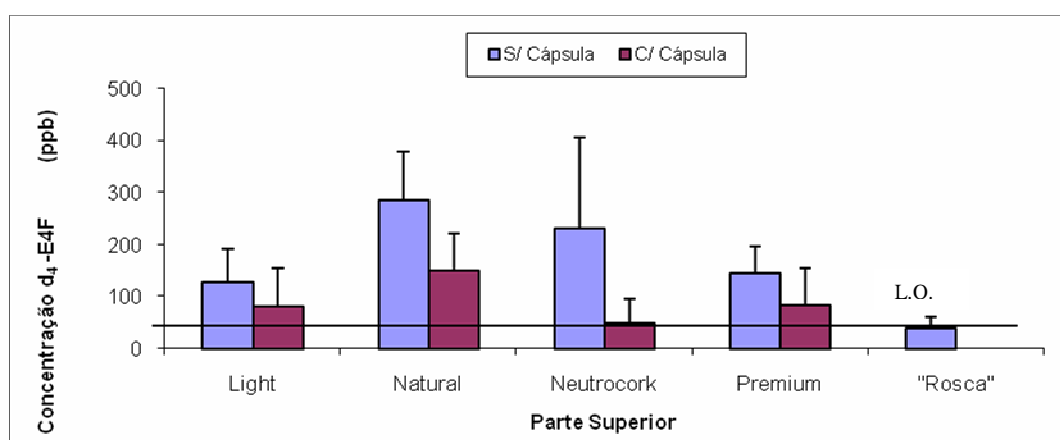


Figura 6 – Concentração de  $d_4$ -E4F na parte superior dos diferentes vedantes com e sem cápsula.

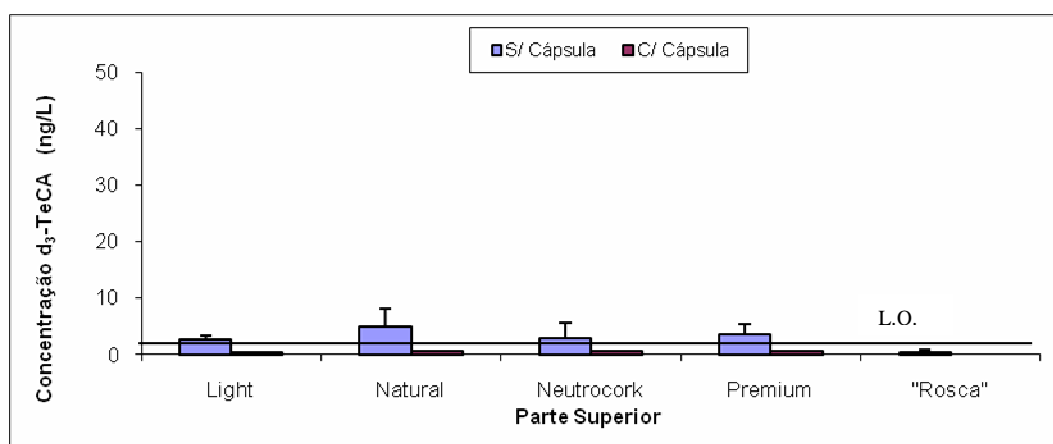


Figura 7 – Concentração de  $d_3$ -TeCA na parte superior dos diferentes vedantes com e sem cápsula.

Na parte média e inferior dos vedantes não se detectaram nenhum dos compostos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados anteriormente por Capone *et al.* (2002) que demonstrou que em 90 % dos casos o  $d_5$ -TCA ficava absorvido na parte superior da rolha de cortiça natural. Recentemente, Lopes (2008) também mostrou que após o 1 mês de conservação, os compostos ficavam maioritariamente retidos na parte superior das rolhas de cortiça; contudo a parte média dos vedantes sintéticos, Nomacorc classic, já apresentavam alguma contaminação mas em menor escala do que no topo externo. No entanto, as concentrações dos contaminantes utilizados no presente estudo foram inferiores às utilizadas por Lopes (2008).

No caso das cápsulas rosca, observou-se que os “liners” não absorveram nenhum dos contaminantes, o que mostra que o alumínio impede a migração destes compostos através da cápsula. As cápsulas de rosca funcionaram como barreiras efectivas à transmissão dos contaminantes exógenos. Estes resultados estão de acordo com as propriedades barreira ao oxigénio destes vedantes, como foi demonstrado por Lopes *et al.* (2007), o oxigénio que permeia através deste vedante é residual.

Aquando as análises aos vinhos e às soluções de maceração os compostos  $d_3$ -PCA e  $d_4$ -E4G foram detectados abaixo do limite de quantificação, recomenda-se então nos próximos pontos de análise uma exploração mais aprofundada do método analítico, ou seja, tentar diminuir o limite de quantificação para os diferentes compostos.

Apesar da alocação das garrafas no saco de alumínio ter sido realizada de forma aleatória, observou-se variabilidade na contaminação dentro do mesmo tipo de vedante, provavelmente devido ao efeito posição da garrafa. Nos próximos pontos de análise recomenda-se um

controlo mais apertado da posição de cada garrafa na caixa, ou seja, da sua distância ao papel de filtro, região que provavelmente se encontra mais concentrada nos contaminantes em estudo.

O factor tempo é fundamental, neste tipo de estudos, pois como foi observado por Lino (2008), compostos halogéneos exógenos ( $d_5$ -TCA e  $^{13}C_6$ -TCF) migram através dos vedantes sintéticos contaminando vinho engarrafado após somente 3 meses de conservação. Enquanto as rolhas de cortiça, natural e microaglomeradas, funcionam como barreiras efectivas à migração de contaminantes atmosféricos.

Estes resultados mostram claramente que os vedantes, quando armazenados sob atmosferas contaminadas, possuem a capacidade de sorver cloroanisóis e fenóis voláteis por via aérea. Sendo a sorção destes contaminantes extremamente rápida. Contudo, não se deve descurar o facto de que o estudo ainda se encontra numa fase prematura, não se podendo ainda afirmar que todos os vedantes funcionam como barreiras efectivas a este tipo de contaminantes.

## 5. Conclusões

Este projecto é um contributo fundamental para o esclarecimento do fenómeno envolvido na contaminação de vinhos após o engarrafamento, nomeadamente quando estes são conservados sob atmosfera altamente contaminada com cloroanisóis e/ou fenóis voláteis.

A sorção de contaminantes atmosféricos por parte dos vedantes, à excepção das cápsulas de rosca, é extremamente rápida observando-se ao fim do primeiro mês de conservação um teor elevado de  $d_5$ -TCA,  $d_3$ -TeCA e  $d_4$ -E4F na parte superior dos vedantes. No entanto, todos os vedantes testados funcionaram como barreira à migração de cloroanisóis e fenóis voláteis deutérios para o vinho engarrafado.

A cápsula de PVC afecta significativamente a absorção dos contaminantes na parte superior dos vedantes testados.

Os sacos de complexo de alumínio são barreiras efectivas à migração de  $d_5$ -TCA e poderão ser utilizados futuramente para acondicionar rolhas de cortiça, mesmo em locais contaminados.

## **6. Avaliação do trabalho realizado**

### **6.1 Objectivos realizados**

Este trabalho pretendeu esclarecer qual a contribuição que o tipo de vedante (cortiça, sintético e rosca) pode ter na restrição ou amplificação dos efeitos do fenómeno envolvido na contaminação de vinhos após o engarrafamento, nomeadamente quando estes são conservados sob atmosfera altamente contaminada, com cloroanisóis e fenóis voláteis. O estudo flui nesse sentido, no entanto, dada a duração do estágio, apenas foi possível realizar o ponto de análise após o primeiro mês de conservação.

Contudo, o factor tempo é muito importante neste tipo de estudos.

Paralelamente:

- Iniciou-se o desenvolvimento e optimização de um novo método analítico que permitiu detectar e quantificar os 5 contaminantes estudados, numa única análise;
- Determinou-se a eficácia do filme “protective packaging”, como embalagem protectora de rolhas conservadas em ambiente contaminado com d<sub>5</sub>-TCA;
- Avaliou-se o efeito protector da cápsula de PVC sobre o gargalo.

### **6.2 Outros trabalhos realizados**

Para além da execução da tese, participou-se também em outras actividades com vista a amplificar o leque de conhecimentos sobre o tema de defesa.

Durante todo o período de realização do projecto disponibilizou-se auxílio à rotina diária de trabalho da equipa do laboratório de controlo de qualidade do I&D, da Amorim & Irmãos, principalmente na preparação de amostras para detecção de 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Participou-se também em algumas tarefas de outros projectos em curso no I&D.

Foi ainda possível conhecer as instalações da SOGRAPE Vinhos de Portugal S.A., localizadas em Avintes, para participar no engarrafamento. E algumas das instalações pertencentes ao grupo Amorim, nomeadamente Amorim & Irmãos, Portocork e Champcork, em Santa Maria de Lamas.

Cooperou-se também em algumas actividades do projecto: “ Migração de TCA e TCF através de diferentes vedantes – Influência da barreira Acquamark” realizado por um aluno da FEUP-DEQ, Joaquim Coelho, aquando da elaboração da sua tese de mestrado no departamento do I&D da Amorim & Irmãos

### **6.3 Limitações e trabalhos futuros**

A duração total do projecto foi condicionada por alguns factores, tais como, a utilização de cromatografos, que estava limitada à rotina de análises do departamento e a colaboração de entidades externas (Sogrape), originando alguns atrasos.

Este estudo foi projectado para 24 meses, contudo, dada a duração do estágio, não foi possível concluí-lo, sendo apenas possível realizar o primeiro ponto de análise após o primeiro mês de conservação. No entanto, reuniram-se todas as condições de modo a assegurar a continuidade do projecto por parte da empresa.

Sugere-se que, o método analítico otimizado englobe um maior número de contaminantes. E uma possível adaptação de um modelo teórico aos resultados experimentais, difusão em rolhas de cortiça e permeabilidade em vedantes sintéticos, para num futuro próximo ser possível prever o comportamento de um vedante quando exposto a uma atmosfera contaminada, com uma determinada concentração de cloroanisóis e/ou fenóis voláteis.

### **6.4 Apreciação final**

Actualmente, existem poucos estudos sobre o fenómeno envolvido na contaminação de vinhos após o engarrafamento, nomeadamente quando estes são conservados sob atmosfera altamente contaminada. Este trabalho apresenta-se assim como um contributo fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de contaminação do vinho, com cloroanisóis e fenóis voláteis, e em que medida o tipo de vedante pode contribuir para a restrição ou amplificação dos efeitos deste fenómeno. A compreensão global deste problema é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes na sua resolução. A hipotética migração dos contaminantes através dos vedantes sintéticos e o efeito barreira proporcionado pelas rolhas de cortiça, serão argumentos de uma enorme valia científica e comercial não só para a Amorim & Irmãos S.A. como para todo o sector corticeiro.

O desenvolvimento e optimização de um novo método analítico foi essencial, pois num futuro próximo permitirá ao departamento de I&D da Amorim fornecer um serviço eficiente aos seus clientes, nomeadamente em termos de reclamações.

Por outro lado validou-se uma embalagem protectora que poderá ser utilizada futuramente para acondicionar rolhas de cortiça, mesmo em locais contaminados.

A realização de diferentes actividades na prossecução do projecto permitiu reconhecer a vertente multifacetada que um engenheiro deve possuir para desempenho de excelência da sua profissão.



## 7. Referências

- ✓ Álvarez-Rodríguez, M.L., *Análisis de la producción de 2,4,6-tricloroanisol por hongos filamentosos aislados de corcho*. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Universidad de Extremadura., **2003**;
- ✓ Amon, J.M. e Simpson, R. F. Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance; *Australian Grapegrower and Winemaker*, 268, 63-80; **1986**;
- ✓ Amon, J.M.; Vandeeper, J.M. e Simpson, R.F., *Compounds responsible for cork taint*. *Aust. Ans New Zeal. Wine Ind. J.*, 4, 62-69; **1989**;
- ✓ APCOR, *Anuário da Associação Portuguesa de Cortiça*, **2009**;
- ✓ Barker, D. A., Capone, D. L., Pollnitz, A. P., McLean, H. J., Francis, I. L., Oakey, H. e Sefton, M. A., *Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via vapour phase in an enclosed environment*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 40-46; **2001**;
- ✓ Boutou, S. e Chatonnet, P., *Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine*. *Journal of Chromatography A*, 1141, 1-9; **2007**;
- ✓ Buser, H-R.; Zanier, C. e Tanner, H., *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*. *J. Agr. Food Chem.*, 30, 359-362; **1982**;
- ✓ Butzke, C.E.; Evans, T.J. e Ebeler, S.E., *Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM*. *Chemistry of wine flavour.*, **1999**;
- ✓ Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Barker, D. A., McLean, H. J., Pollnitz, A. P. e Sefton, M. A., *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98; **1999**;
- ✓ Capone, D. L., Skouroumounis, e Sefton, M. A., *Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 196-199; **2002**;
- ✓ Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N. e Pons, M., *The origin of ethylphenols in wines*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165-178; **1992**;
- ✓ Chatonnet, P.; Guimberteau, G.; Dubourdieu, D. e Boidron, J.N., *Nature et origine des odeurs de moisi dans les caves. Incidence sur la contamination des vins*. *J. Int. Sci. Vigne et du Vin.*, 28, 131-151; **1994**;
- ✓ Chatonnet, P.; Dubourdieu, D. e Boidron, J.N., *The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 463-468; **1995**;
- ✓ Chatonnet, P.; *Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne*. Thèse Doctorat de L'Université de Bordeaux II; **1995**;
- ✓ Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. e Labadie, M. D., *Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1255-1262; **2004**.

- ✓ Coque, J. J. R.; Pérez, E. R.; Goswami, M.; Martínez, R. F.; García, S. C.; *Contaminação do vinho por Haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis*; Versão Portuguesa, INBIOTEC, APCOR, pág. 3-59, Santa Maria de Lamas, Portugal, **2006**;
- ✓ Di Stefano, R.; *Gli etil fenoli nei vini*. Vignevis, 5, 35-38; **1985**;
- ✓ Froudière, I. e Larue, F.; *Conditions de survie de Brettanomyces (Dekkera) dans le mout de raisin et le vin*. In: Actualités Oenologiques, Séances du Symposium International d'Oenologie, Bordeaux, 297-303; **1989**;
- ✓ Fugelsang, K. C.; Osborn, M. M. e Muller, C. J.; *Brettanomyces and Dekkera – Implications in wine making*. In: *Beer and wine production: analyses, characterization and technological advances*; Ed. Barry H. Gump. ACS Symposium series 536, American Chemical Society, Washington. Cap. 7, 110-119; **1993**;
- ✓ ITV France; *Brettanomyces et phénols volatils. Prévenir et limiter les altérations*. Les cahiers itinéraires d'itv France, n°12, Julho, 4 e 17, **2006**;
- ✓ Juanola, R.; Subirá, D. e Anticó, E., *Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine.*, Eur. Food Res. Technol., 220, 347-352; **2005**;
- ✓ Lee, T.H. e Simpson, R.F., *Microbiology and chemistry of cork taints in wine*. Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers., pp 353-372; **1993**;
- ✓ Lino, J.M., *Migração de d5-TCA através de vedantes em vinho e Método para envelhecimento acelerado de um vinho.*, Tese de Mestrado Integrado, FEUP, Portugal, **2008**;
- ✓ Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P., *Main route of oxygen ingress through different closures into wine bottles*, J. Agric. Food Chem., 55, 5167-5170; **2007**;
- ✓ Lopes, T., *Estudos de Migração de 2,4,6-tricloroanisol através de vedantes.*, Tese de Mestrado Integrado, FEUP, Portugal, **2008**;
- ✓ Loureiro, V; *Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade*. Revista dos Vinhos, 42-46; **1996**;
- ✓ Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M.; *Spoilage yeasts in the wine industry*. International Journal of Food Microbiology 86, 23–50; **2003**;
- ✓ Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M.; *Spoilage activities of Dekkera/Brettanomyces spp.* In: Blackburn, C. (ed.) Food spoilage microorganisms (pp. 354–398). Woodhead Pubs, Cambridge; **2006**;
- ✓ Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J., Loureiro, V.; *Infecting yeasts in Portuguese bottled white wines*. Proceedings of the XIIIth International Symposium on Yeasts. Leuven, Belgium, 34– 35; **1989**;
- ✓ Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N. e Loureiro, V., *The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines*. Actas do 7th International Enology Symposium, 1 a 2 Junho. Pavia, Itália; **2000**;
- ✓ Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N. e Loureiro, V.; *The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines*. Italian Food Bev. Technol., 24, 34–38; **2001**;
- ✓ Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K. e Sefton, M. A., *The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks.*, Australian Journal of grape and wine Research, 2, 184-190; **1996**;
- ✓ Saxby, M.J.; Reid, W.J. e Wragg, G.S., *Index of chemical taints*. Leatherhead Food., **1982**;

- ✓ Simpson, R.F.; Capone, D.L. and Sefton, M.A., *Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks*. J. Agric. Food Chem., 52, 5425-5430; **2004**;
- ✓ Simpson, R.F.; Capone, D.L., Duncan, B.C. e Sefton, M.A., *Incidence and nature of “fungal must” taint in wine corks*. Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 20 (I), 26-31; **2005**;
- ✓ Steinke, R. D. and Paulson, M.C., *The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain*. Agricultural and Food Chemistry, 12, 381-387; **1964**;

## 8. Anexos

### A - Método Analítico

I. Método de análise: *SPME-GC/MS* - micro extração em fase sólida com separação por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa.

II. Equipamento utilizado:

- *Cromatógrafo Gasoso*: Agilent 6890;
- *Detector*: Espectroscopia de Massa Agilent 5973;
- *Auto-Sampler*: Gerstel MPS2, nº série 121694;
- *Programa de aquisição de dados*: Enhanced Chemstation, G1701 CA Version C.00.00 21-Dec-1999, Copyright © Agilent Technologies 1989-1999;
- *Fibra*:
  - Quantificação de d<sub>5</sub>-TCA: Sigma-Aldrich Co., com 100 µm de um revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS);
  - Quantificação dos 5 contaminantes: DVB/CAR/PDMS (diferente da utilizada na rotina do laboratório);
- *Coluna*: Varian, FactorFour™ Capillary Column VF-5ms 30 m x 0,32mm, 0,25µm.

III. Condições operatórias gerais do GC/MS para detecção de d<sub>5</sub>-TCA:

- ✓ Temperatura do injector – 270 °C;
- ✓ Gás de arrasto – Hélio;
- ✓ Temperatura do *Transfer Line* – 280 °C;
- ✓ Programa de temperaturas: 90 °C por 0 min, rampa de aquecimento de 10 °C/min até 205 °C durante 11,50 min. Seguidamente nova rampa de aquecimento de 30 °C/min. até aos 280 °C, durante 2,5 min. Tempo total de 14 minutos.

## **B – Modo operatório**

- I. Macerações para quantificação dos contaminantes: Colocar num frasco de vidro, com capacidade até 60mL, o vedante (ou parte dele) que se pretende analisar; perfazer o volume do mesmo com solução hidroalcoólica 12% (v/v); cobrir o topo do frasco com papel de alumínio e fechar com a respectiva tampa; deixar a macerar durante 24 h à temperatura ambiente.
  
- II. Preparação da solução hidroalcoólica 12% (v/v) - adicionar 240 mL de etanol 96% num balão volumétrico de 2L e perfazer o volume com água destilada.
  
- III. Preparação das amostras para quantificação de d<sub>5</sub>-TCA no GC/MS - Num vial de 20 mL que contém ±3 g de NaCl, adiciona-se 10 mL de amostra (solução de maceração) e 100 µL de d<sub>5</sub>-TBA (padrão interno), de concentração 20 µgL<sup>-1</sup>. Agitar a amostra para promover a mistura. No GC-MS, seleccionar o método e iniciar a sequência de análise.

## C – Calibração

A quantificação de cada composto é baseada na sua comparação com o respectivo padrão interno e relacionada com curvas de calibração previamente traçadas, nas gamas de concentração de interesse.

Como os cromatografos são equipamentos muito sensíveis é aconselhável efectuar a leitura de padrões e/ou brancos no início, meio e fim de cada série de amostras e rectas de calibração regularmente.

Os padrões utilizados nas curvas de calibração devem ser preparados na matriz desejada (vinho ou solução hidroalcoólica). Neste estudo, realizou-se curvas de calibração em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

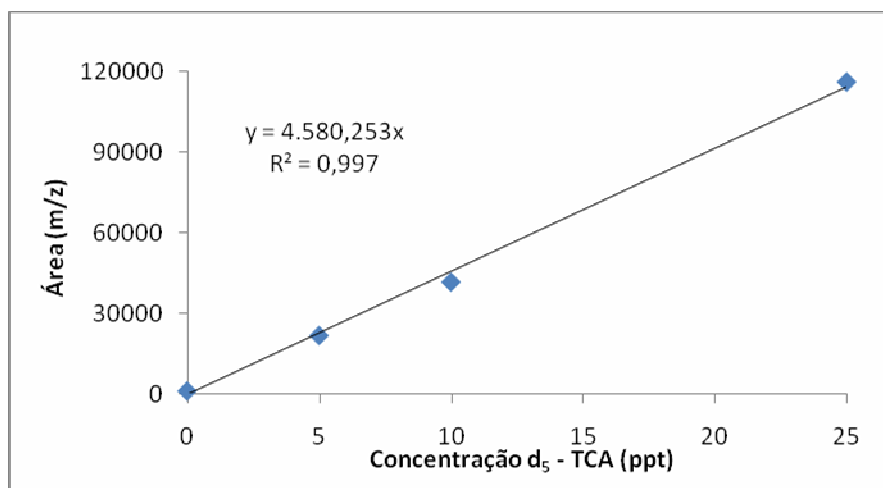


Figura 8 – Curva de calibração do  $d_5$ -TCA [0-25]  $\text{ngL}^{-1}$ , em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

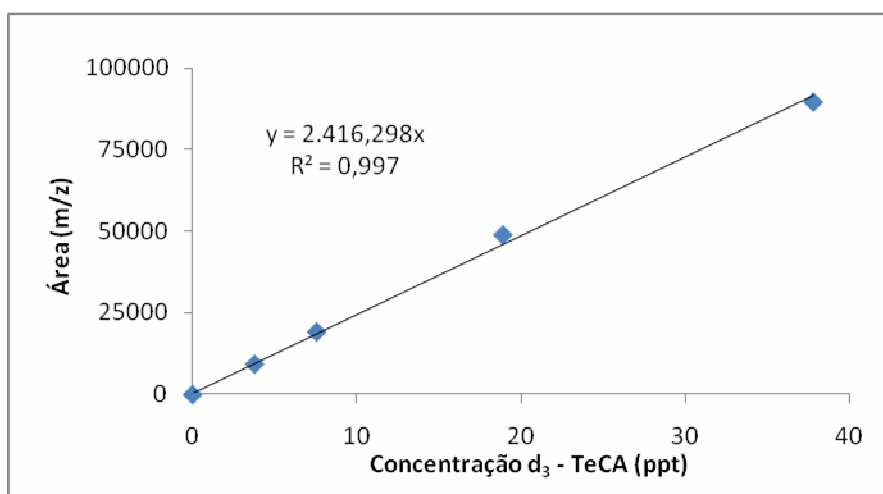


Figura 9 – Curva de calibração do  $d_3$ -TeCA [0-38]  $\text{ngL}^{-1}$ , em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

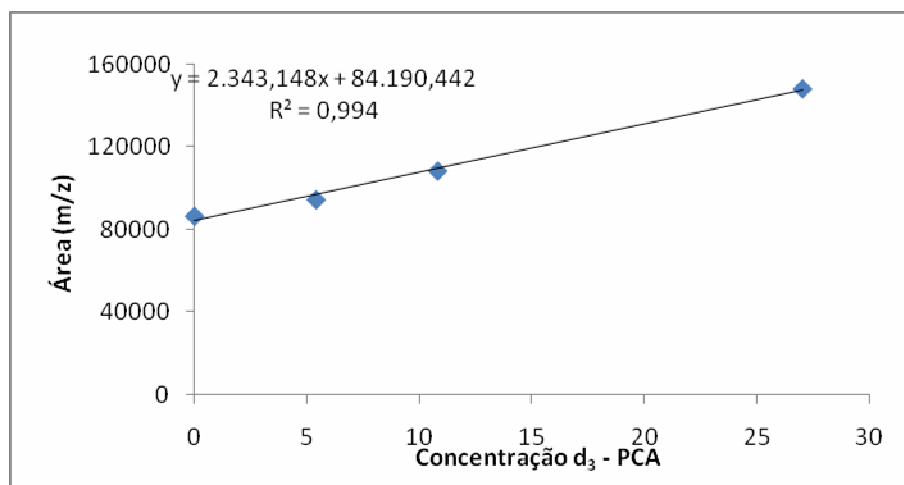


Figura 10 – Curva de calibração do d<sub>3</sub>-PCA [0-27] ngL<sup>-1</sup>, em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

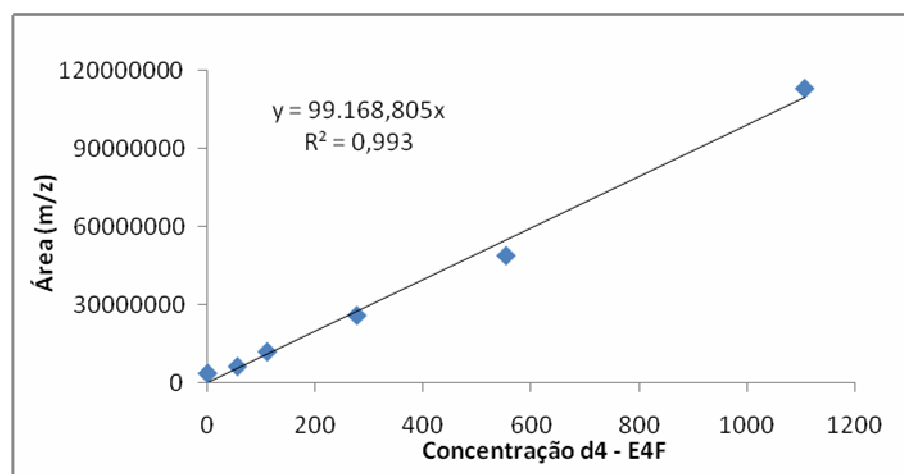


Figura 11 – Curva de calibração do d<sub>4</sub>-E4F [0-1100] μgL<sup>-1</sup>, em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

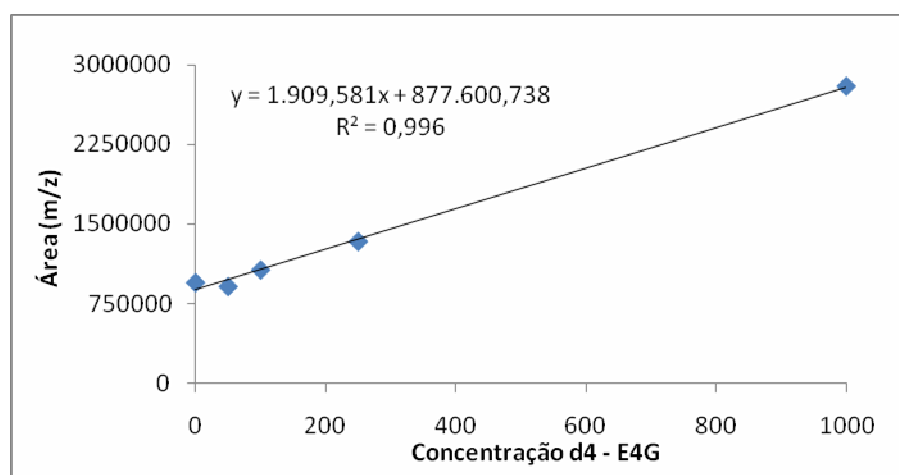


Figura 12 – Curva de calibração do d<sub>4</sub>-E4G [0-1000] μgL<sup>-1</sup>, em solução hidroalcoólica 12% (v/v).

## E - Tratamento dos Resultados do GC/MS

A quantificação de cada composto é baseada na sua comparação com o respectivo padrão interno, ou seja, para cada amostra, após integração dos picos correspondentes ao padrão interno e ao contaminante, obtém-se a área do contaminante ( $A_{cont}$ ) e a do respectivo padrão interno ( $A_{p.i.}$ ). Depois de se obter as áreas de todas as amostras analisadas calcula-se o valor médio da área do padrão interno ( $A_{m.p.i.}$ ). Em seguida, relaciona-se as áreas dos contaminantes com as dos padrões internos, ou seja, calcula-se o valor corrigido da área do contaminante ( $A_{cont}^*$ ):

$$A_{cont}^* = \frac{A_{m.p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (E.1)$$

Finalmente, determina-se a concentração do contaminante ( $C_{cont}$ ) substituindo  $A_{cont}^*$  na equação da respectiva curva de calibração.

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (E.2)$$

Logo, a concentração é dada por:

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (E.3)$$



## F – Especificações

*Tabela A.1 – Características das rolhas naturais utilizadas no projecto, obtidas pelo Medcork.*

<b>Rolha</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa Volúmica Aparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Humidade (%)</b>
1	38,2	24,1	2,7	154,4	5,5
2	38,7	24,0	2,4	135,6	5,4
3	38,3	24,0	2,9	170,4	5,1
4	38,2	24,0	2,8	160,3	5,7
5	38,1	23,9	3,0	175,1	5,4
6	38,2	24,2	2,5	141,0	5,6
7	38,4	24,1	2,9	166,4	6,3
8	38,2	24,0	3,7	215,5	5,8
9	38,4	24,3	3,4	193,1	4,9
10	38,4	24,2	2,4	136,6	6,0
11	38,4	24,0	3,0	174,9	5,0
12	38,3	24,1	3,0	170,6	5,5
13	38,4	24,0	3,3	190,8	5,1
14	38,4	24,1	2,8	156,8	5,3
15	38,4	24,3	3,0	167,2	5,5
16	38,1	23,8	3,6	215,0	6,0
17	38,3	24,2	3,0	169,3	5,8
18	38,4	24,0	3,3	189,9	5,4
19	38,2	24,2	3,8	216,4	5,5
20	38,2	24,0	2,8	160,9	5,1
21	38,4	24,2	2,8	156,5	5,0
22	38,5	24,1	2,6	150,2	6,3
23	38,3	24,2	2,3	128,5	5,8
24	38,3	24,1	2,5	141,5	5,8
25	38,3	24,0	3,0	173,2	5,7
26	38,4	24,3	3,1	171,2	5,9
27	38,3	23,9	2,9	170,1	5,5
28	38,4	24,1	2,8	161,2	5,3
29	38,4	24,0	3,4	197,9	5,3
30	38,1	24,0	2,5	146,4	5,3
31	38,5	24,0	2,8	162,7	6,5
32	38,2	24,3	2,8	159,6	5,2
33	38,4	24,2	2,9	164,0	5,3
34	38,3	24,1	3,2	181,1	5,4
35	38,2	24,0	2,6	151,1	5,3
36	38,3	24,2	2,9	166,8	5,0
37	38,5	23,9	2,3	133,3	5,5
38	38,4	23,9	2,7	158,9	6,0
39	38,4	24,2	3,6	204,6	5,7
40	38,3	24,0	2,6	150,0	6,3
41	38,4	23,9	3,0	172,7	6,0
42	38,5	24,1	2,9	163,6	4,9
43	38,4	24,2	3,0	169,1	5,5
44	38,3	24,0	3,2	185,8	5,7
45	38,3	24,1	2,8	157,2	5,7
46	38,5	24,3	2,7	152,2	5,6
47	38,0	24,0	2,5	147,5	5,1

48	38,4	24,3	2,4	134,7	5,7
49	38,3	24,0	2,8	161,3	6,1
50	38,5	24,0	3,3	188,4	6,0
51	38,3	24,2	3,0	169,7	5,2
52	38,3	24,1	2,5	141,5	5,0
53	38,4	24,1	3,1	178,3	5,1
54	38,4	24,1	3,2	179,6	5,7
55	38,5	24,2	2,7	150,2	5,5
56	38,3	24,2	2,9	166,7	5,5
57	38,3	24,1	3,2	182,3	5,2
58	38,4	24,1	2,9	164,9	5,6
59	38,4	24,0	3,4	196,4	5,4
60	38,4	24,3	2,4	136,4	5,0
61	38,4	24,2	3,0	171,0	5,2
62	38,2	24,2	3,0	168,8	5,4
63	38,5	24,1	2,7	151,9	5,7
64	38,4	24,2	3,0	168,7	5,3
65	38,0	24,1	2,5	146,0	5,2
66	38,3	24,1	2,8	158,0	6,6
67	38,5	24,3	2,4	136,1	6,1
68	38,3	24,1	2,9	168,0	5,5
69	38,4	24,2	4,0	228,1	5,5
70	38,3	24,2	3,1	178,2	5,2
71	38,3	24,2	2,9	162,1	5,2
72	38,4	24,0	2,5	143,9	5,2
73	38,2	24,0	2,5	144,7	5,5
74	38,4	24,0	3,0	170,2	5,4
75	38,2	24,1	3,0	172,6	5,6
76	38,4	24,0	2,8	159,9	6,0
77	38,5	24,1	2,4	139,1	5,4
78	38,0	24,1	2,5	143,2	5,0
79	38,4	24,3	2,9	165,4	5,0
80	38,5	23,9	3,1	180,3	5,8
81	38,3	24,1	2,9	162,7	5,1
82	38,4	24,0	3,6	205,1	6,1
83	38,5	24,1	2,9	165,1	6,5
84	38,1	24,1	2,5	141,7	5,8
85	38,3	24,1	3,2	181,6	6,3
86	38,2	23,9	3,4	201,7	5,8
87	38,1	23,9	2,8	165,3	5,6
88	38,4	23,9	3,0	172,2	5,1
89	38,3	24,2	2,9	164,1	5,8
90	38,4	24,1	3,1	176,1	4,9
91	38,5	24,2	3,1	176,9	5,6
92	38,3	24,1	3,0	172,8	5,4
93	38,3	23,9	3,7	213,2	5,5
94	38,2	23,7	3,3	196,0	5,5
95	38,3	24,1	2,9	168,1	5,6
96	38,4	24,2	2,4	133,8	5,0
97	38,2	24,2	3,0	169,3	5,2
98	38,6	24,4	3,3	184,1	5,5
99	38,3	24,1	2,8	158,1	5,7
100	38,3	24,1	3,4	195,6	5,2
Média	38,3	24,1	2,9	167,5	5,5
Desvio Padrão	0,13	0,12	0,36	20,74	0,39

*Tabela A.2 – Características das rolhas Neutrocork utilizadas no projecto, obtidas pelo Medcork.*

<b>Rolha</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Diâmetro Médio (mm)</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa Volúmica Aparente (g/Cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Humidade (%)</b>
1	38,0	24,0	5,3	310,5	6,4
2	38,0	23,9	4,9	286,7	6,4
3	38,2	24,0	4,9	284,0	6,0
4	38,1	23,9	5,0	294,5	6,3
5	38,1	24,2	5,7	327,4	6,3
6	38,3	24,0	5,4	312,8	6,1
7	38,1	24,0	5,3	309,4	5,7
8	38,0	24,0	5,0	289,2	6,3
9	37,9	23,9	4,9	290,3	6,3
10	38,0	24,0	5,0	293,8	6,4
11	38,1	23,9	5,1	298,9	6,1
12	38,3	24,0	5,2	300,8	6,2
13	38,0	23,9	4,8	283,0	6,2
14	38,0	24,1	4,9	283,9	6,0
15	38,0	23,9	5,2	302,6	6,1
16	38,1	23,9	4,7	274,3	6,0
17	38,1	23,9	4,8	278,7	6,1
18	37,8	23,8	4,9	291,7	6,4
19	38,1	23,9	5,2	300,8	6,0
20	38,2	24,0	5,1	296,8	6,0
21	38,3	24,0	5,1	294,2	6,0
22	38,2	24,0	5,3	305,0	6,0
23	38,1	24,0	4,9	285,3	6,2
24	37,9	23,8	4,8	284,3	6,3
25	38,2	24,2	5,3	300,3	6,0
26	37,9	24,0	4,7	272,8	6,2
27	38,0	23,9	5,1	296,6	6,2
28	38,2	24,0	4,9	284,3	5,7
29	38,0	24,0	4,8	279,0	6,0
30	38,0	23,9	5,1	296,5	6,0
31	38,0	23,9	4,9	284,4	6,1
32	37,9	24,0	5,2	300,5	6,1
33	38,0	24,0	4,9	286,3	6,2
34	38,1	24,0	5,5	319,5	6,4
35	38,0	24,0	5,1	296,6	6,3
36	38,1	24,2	5,2	298,0	6,3
37	38,0	23,9	5,0	294,9	6,1
38	37,8	24,0	4,6	268,2	6,1
39	38,0	23,9	4,9	284,8	6,1
40	38,2	24,1	5,2	296,3	6,3
41	38,1	23,9	5,1	297,0	6,3
42	38,1	24,0	5,2	300,4	6,0
43	38,1	24,1	4,8	279,4	6,0
44	37,9	23,9	5,1	302,6	6,5
45	38,0	24,0	5,0	291,1	6,3
46	38,0	24,0	4,8	277,5	5,8
47	38,0	23,9	5,0	293,6	6,1
48	38,2	24,0	5,2	298,4	5,7
49	38,3	24,0	5,2	302,7	5,5
50	38,0	24,0	5,1	299,6	6,2
51	38,0	23,9	5,0	291,9	6,1

52	38,1	23,9	5,1	298,3	6,2
53	38,3	24,1	5,1	292,4	5,6
54	38,3	24,0	5,3	304,1	6,1
55	38,1	24,0	5,4	311,4	6,3
56	38,0	23,9	4,8	281,8	6,2
57	38,0	23,9	5,1	299,5	6,3
58	38,1	24,1	5,2	302,1	6,4
59	37,9	24,0	4,9	285,6	6,2
60	38,1	24,0	5,1	298,1	6,0
61	38,0	24,0	5,1	294,2	6,1
62	38,2	24,0	5,4	313,8	5,8
63	37,9	23,9	4,7	276,6	6,1
64	38,0	24,0	4,9	287,9	6,2
65	37,9	23,9	4,8	282,9	6,1
66	38,1	24,0	5,1	296,1	6,2
67	38,2	24,0	5,3	305,1	6,0
68	38,2	24,0	5,4	309,0	6,0
69	38,1	24,0	5,2	299,8	6,0
70	38,1	23,9	4,7	275,0	5,8
71	38,3	24,0	5,4	313,5	5,7
72	38,2	24,1	5,2	297,8	5,8
73	38,1	23,9	5,1	294,7	6,1
74	38,0	23,9	5,0	295,3	6,0
75	38,2	24,0	5,2	301,1	6,2
76	38,0	24,1	5,3	304,2	6,0
77	38,2	24,0	5,3	306,5	5,8
78	38,0	24,1	4,9	281,6	5,6
79	38,0	24,0	4,7	273,8	6,0
80	38,1	23,9	4,9	285,0	6,1
81	38,0	24,0	5,0	293,3	6,0
82	38,1	24,0	5,1	293,4	6,0
83	38,1	24,0	5,0	287,9	6,1
84	38,2	24,0	5,3	305,0	5,7
85	38,1	23,9	4,9	286,8	6,0
86	38,1	24,0	5,0	289,8	6,2
87	37,9	23,9	4,9	287,3	6,4
88	38,1	24,0	4,6	269,6	5,6
89	38,1	24,0	5,2	299,0	6,1
90	37,9	23,9	4,9	286,2	6,3
91	38,1	24,0	5,4	312,3	5,7
92	37,9	24,0	4,9	284,0	6,2
93	38,0	23,9	5,0	294,3	6,0
94	38,0	23,9	5,0	294,7	6,3
95	38,1	23,9	5,1	298,4	5,8
96	37,8	23,8	4,8	286,9	6,2
97	38,1	24,0	5,1	297,8	6,0
98	38,0	23,9	5,2	302,0	6,4
99	38,1	24,0	4,6	269,5	5,5
100	38,3	24,0	5,3	304,2	5,8
Média	38,1	24,0	5,0	293,8	6,1
Desvio padrão	0,12	0,07	0,21	11,30	0,22

*Tabela A.3 – Características dos vedantes Nomacorc light utilizados no projecto, obtidas pelo Medcork.*

<b>Rolha</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Diâmetro Médio (mm)</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa Volúmica Aparente (g/Cm<sup>3</sup>)</b>
1	39,9	21,6	4,7	324,7
2	39,7	21,8	4,8	320,2
3	39,3	22,1	4,9	323,0
4	39,7	21,8	4,8	322,4
5	39,5	22,1	4,9	320,2
6	39,6	21,6	4,7	322,4
7	39,7	21,8	4,8	322,7
8	39,6	21,7	4,8	325,8
9	39,7	21,3	4,8	337,7
10	39,7	21,7	4,9	335,1
11	39,7	22,1	4,9	324,0
12	39,6	21,8	4,8	324,7
13	39,7	21,9	4,8	319,0
14	39,5	22,0	4,7	316,0
15	39,9	21,8	4,8	323,4
16	39,6	21,8	4,8	323,1
17	39,6	21,6	4,8	334,4
18	39,7	21,6	4,8	326,9
19	39,7	21,7	4,7	319,7
20	39,8	21,8	4,8	322,3
21	39,6	21,9	4,8	323,3
22	39,6	21,9	4,9	329,5
23	39,6	21,9	4,8	320,6
24	39,6	22,0	4,8	321,4
25	39,7	21,9	4,9	327,9
26	39,7	21,7	4,9	331,4
27	39,7	21,9	4,8	322,7
28	39,8	21,5	4,7	326,5
29	39,6	22,0	5,0	330,0
30	39,7	21,6	4,7	318,4
31	39,6	21,6	4,7	322,1
32	39,7	21,9	4,9	329,1
33	39,7	21,4	4,8	334,4
34	39,7	21,7	4,8	326,6
35	39,6	21,7	4,8	324,2
36	39,6	21,8	4,8	324,5
37	39,7	22,1	4,8	318,4
38	39,5	21,7	4,7	321,3
39	39,6	21,8	4,3	287,7
40	39,7	21,6	4,8	326,7
41	39,6	21,5	4,8	335,3
42	39,7	22,0	4,8	317,0
43	39,6	21,7	4,7	316,9
44	39,7	21,7	4,8	326,3
45	39,7	21,5	4,9	339,7
46	39,8	21,8	4,8	321,9
47	39,8	22,0	5,0	328,5
48	39,7	21,8	4,9	328,9
49	39,7	21,5	4,8	329,1
50	39,5	22,0	4,9	325,7
51	39,7	21,6	4,8	328,5

52	39,8	21,6	4,9	334,0
53	39,8	21,5	4,7	327,2
54	39,8	21,6	4,7	323,0
55	39,8	21,4	4,8	337,8
56	39,6	21,9	4,9	327,2
57	39,7	22,0	4,8	319,0
58	39,8	21,6	4,8	329,2
59	39,8	21,7	4,8	324,4
60	39,8	21,7	4,8	325,4
61	39,7	21,9	4,8	322,6
62	39,7	21,4	4,8	336,9
63	39,7	21,7	4,8	324,7
64	39,6	22,2	4,8	312,3
65	39,7	22,0	4,9	325,0
66	39,7	21,6	4,8	329,0
67	39,7	21,5	4,7	328,0
68	39,7	21,7	4,8	327,2
69	39,7	21,9	4,8	320,4
70	39,7	21,5	4,9	338,5
71	39,5	22,0	4,8	321,1
72	39,7	22,0	4,9	322,7
73	39,8	21,8	4,7	318,3
74	39,6	22,2	4,8	311,6
75	39,8	21,7	4,8	326,3
76	39,6	21,5	4,7	328,7
77	39,6	21,9	4,8	320,7
78	39,7	21,9	4,9	324,4
79	39,8	21,6	4,8	325,5
80	39,6	21,9	4,8	321,0
81	39,6	21,8	4,9	332,1
82	39,5	21,7	4,9	330,4
83	39,7	22,0	4,8	317,4
84	39,6	21,6	4,8	328,5
85	39,7	21,9	4,8	321,7
86	39,7	21,9	4,9	327,7
87	39,7	21,4	4,8	338,6
88	39,8	21,5	4,8	329,1
89	39,7	21,6	4,8	331,0
90	39,6	21,7	4,8	326,3
Média	<b>39,7</b>	<b>21,8</b>	<b>4,8</b>	<b>325,2</b>
Desvio padrão	0,1	0,2	0,1	7,0

*Tabela A.4 – Características dos vedantes SupremeCorq X2 45 utilizados no projecto, obtidas pelo Medcork.*

<b>Rolha</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Diâmetro Médio (mm)</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa Volúmica Aparente (g/Cm<sup>3</sup>)</b>
1	43,6	21,6	8,5	537,0
2	43,7	21,5	8,5	537,6
3	43,5	21,4	8,5	543,7
4	43,6	21,5	8,5	536,8
5	43,0	21,1	8,5	566,7
6	43,7	21,6	8,6	537,2
7	43,7	21,5	8,6	540,2
8	43,7	21,6	8,5	533,5
9	43,6	21,5	8,5	540,3
10	43,7	21,6	8,6	537,2
11	43,5	21,5	8,5	540,4
12	43,5	21,5	8,5	537,9
13	43,7	21,5	8,5	538,5
14	43,5	21,5	8,5	541,6
15	43,4	21,4	8,5	544,0
16	43,6	21,5	8,5	536,7
17	43,3	21,2	8,5	553,5
18	43,4	21,3	8,5	551,8
19	43,6	21,5	8,5	538,6
20	43,5	21,5	8,5	540,2
21	43,8	21,6	8,5	530,9
22	43,8	21,6	8,6	534,0
23	43,6	21,5	8,5	536,2
24	43,5	21,5	8,5	542,5
25	43,3	21,4	8,4	540,4
26	43,7	21,5	8,5	537,9
27	43,5	21,4	8,6	545,1
28	43,5	21,5	8,5	539,2
29	43,8	21,5	8,6	540,9
30	43,6	21,5	8,6	539,5
31	43,8	21,7	8,5	526,9
32	43,6	21,6	8,5	533,8
33	43,6	21,5	8,5	537,0
34	43,6	21,5	8,5	535,4
35	43,6	21,5	8,5	540,6
36	43,6	21,6	8,6	537,6
37	43,3	21,3	8,6	558,1
38	43,2	21,1	8,5	562,0
39	43,3	21,4	8,5	548,5
40	43,6	21,5	8,5	536,6
41	43,3	21,3	8,5	549,1
42	43,5	21,4	8,5	544,2
43	43,7	21,6	8,5	533,1
44	43,4	21,4	8,6	548,5
45	43,4	21,4	8,5	542,8
46	43,8	21,6	8,5	532,8
47	43,6	21,6	8,5	537,1
48	43,8	21,6	8,6	532,4
49	43,6	21,6	8,6	537,5
50	43,6	21,5	8,5	536,4

51	43,5	21,5	8,5	540,9
52	43,4	21,4	8,5	543,4
53	43,5	21,5	8,6	543,5
54	43,6	21,5	8,5	539,2
55	43,4	21,4	8,5	547,8
56	43,6	21,5	8,6	542,3
57	43,6	21,5	8,5	534,0
58	43,5	21,5	8,6	543,0
59	43,5	21,5	8,5	541,0
60	43,6	21,5	8,5	537,9
61	43,6	21,5	8,5	538,6
62	43,6	21,4	8,5	543,7
63	43,6	21,5	8,5	536,6
64	43,6	21,6	8,5	533,7
65	43,5	21,5	8,5	536,3
66	43,7	21,6	8,5	531,5
67	43,5	21,5	8,6	544,2
68	43,6	21,5	8,5	536,7
69	43,6	21,5	8,5	536,8
70	43,2	21,2	8,5	559,1
71	43,5	21,4	8,6	549,4
72	43,7	21,6	8,6	533,1
73	43,2	21,3	8,5	552,5
74	43,4	21,3	8,5	551,1
75	43,6	21,5	8,5	537,8
76	43,7	21,6	8,6	536,8
77	43,7	21,6	8,6	537,0
78	43,5	21,5	8,5	540,5
79	43,7	21,6	8,5	534,4
80	43,6	21,6	8,5	533,5
81	43,5	21,5	8,5	538,8
Média	43,5	21,5	8,5	540,6
DP	0,2	0,1	0,0	7,1



## G - Controlo do perfil do gargalo

	<b>Controlo de Gargalos</b>		Data: 02-02-2009
	AMORIM DISTRIBUIÇÃO		Página 1
<b>Cód. Ensaio:</b>	<b>039/09</b>	<b>Cliente:</b>	ID
<b>Garrafa:</b>	Botijo	<b>Fornecedor:</b>	Barbosa & Almeida, Lda
<b>Marca do Molde:</b>	1315 BA 07 ; 375 ml 001	<b>Operador:</b>	José Carlos
<b>Profundidade:</b>	54 (mm) <b>Dist. do Topo:</b> 3 (mm)	<b>Resolução:</b>	2 mm
<b>Data :</b>	2009-Fev-02	<b>Responsável:</b>	_____
<b>Observações:</b>			

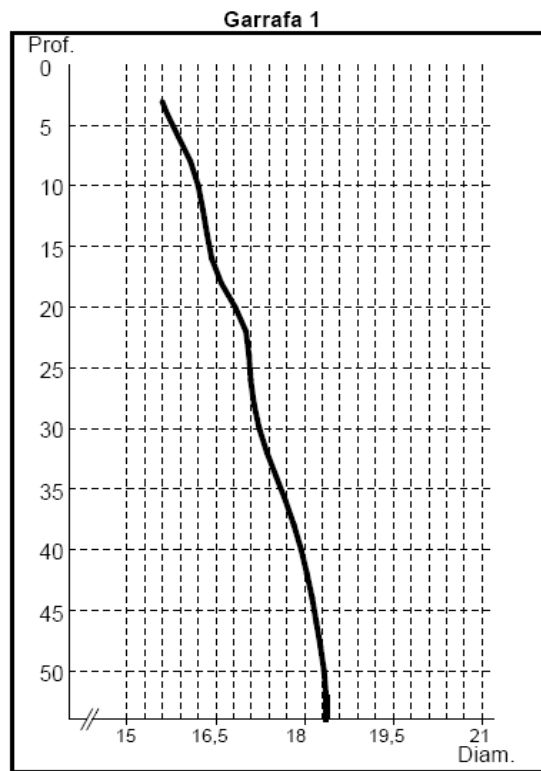
### Média das medidas a 0 e 90 Graus (mm)

Prof.	G1
3,0	15,59
4,0	15,67
6,0	15,87
8,0	16,07
10,0	16,20
12,0	16,28
14,0	16,35
16,0	16,43
18,0	16,59
20,0	16,83
22,0	17,01
24,0	17,06
26,0	17,09
28,0	17,14
30,0	17,23
32,0	17,36
34,0	17,52
36,0	17,68
38,0	17,82
40,0	17,94
42,0	18,04
44,0	18,13
46,0	18,20
48,0	18,27
50,0	18,33
52,0	18,36
54,0	18,36

### Tabela Estatística «Média» (mm)

Prof.	Média	Conicidade	D. Padrão	Mínimo	Máximo
3,0	15,59	0,00	0,06	15,55	15,63
4,0	15,67	0,08	0,08	15,61	15,73
6,0	15,87	0,28	0,12	15,78	15,95
8,0	16,07	0,48	0,15	15,96	16,17
10,0	16,20	0,61	0,17	16,08	16,32
12,0	16,28	0,69	0,19	16,14	16,41
14,0	16,35	0,76	0,21	16,20	16,49
16,0	16,43	0,84	0,21	16,28	16,58
18,0	16,59	1,00	0,22	16,43	16,74
20,0	16,83	1,24	0,23	16,66	16,99
22,0	17,01	1,42	0,35	16,76	17,25
24,0	17,06	1,47	0,42	16,76	17,36
26,0	17,09	1,50	0,46	16,76	17,41
28,0	17,14	1,55	0,52	16,77	17,50
30,0	17,23	1,64	0,54	16,84	17,61
32,0	17,36	1,77	0,54	16,98	17,74
34,0	17,52	1,93	0,51	17,16	17,88
36,0	17,68	2,09	0,49	17,33	18,03
38,0	17,82	2,23	0,47	17,48	18,15
40,0	17,94	2,35	0,46	17,61	18,26
42,0	18,04	2,45	0,45	17,72	18,35
44,0	18,13	2,54	0,42	17,83	18,42
46,0	18,20	2,61	0,40	17,92	18,48
48,0	18,27	2,68	0,38	18,00	18,54
50,0	18,33	2,74	0,37	18,07	18,59
52,0	18,36	2,77	0,34	18,12	18,60
54,0	18,36	2,77	0,34	18,12	18,60

**Desenho pormenorizado «Média» (mm) - Escala 2:1**



**Perfil do Gargalo «Média» (mm) - Escala 2:1**

